

**PENGARUH PREVENTIF EKSTRAK *GREEN COFFEE*  
ROBUSTA (*Coffea canephora*) TERHADAP GAMBARAN  
HISTOPATOLOGI GASTRIUM DAN AKTIVITAS  
PROTEASE PADA TIKUS PUTIH (*Rattus  
norvegicus*) GASTROENTERITIS  
BAKTERIAL**

**SKRIPSI**

Oleh :  
**ANGANTI SOTYO AYU HARINDRI**  
**145130100111032**



**PROGRAM STUDI PENDIDIKAN DOKTER HEWAN  
FAKULTAS KEDOKTERAN HEWAN  
UNIVERSITAS BRAWIJAYA  
MALANG  
2018**

**PENGARUH PREVENTIF EKSTRAK *GREEN COFFEE*  
ROBUSTA (*Coffea canephora*) TERHADAP GAMBARAN  
HISTOPATOLOGI GASTRIUM DAN AKTIVITAS  
PROTEASE PADA TIKUS PUTIH (*Rattus  
norvegicus*) GASTROENTERITIS  
BAKTERIAL**

**SKRIPSI**

Sebagai salah satu syarat untuk memperoleh gelar

Sarjana Kedokteran Hewan

Oleh :

**ANGANTI SOTYO AYU HARINDRI**

**145130100111032**



**PROGRAM STUDI PENDIDIKAN DOKTER HEWAN  
FAKULTAS KEDOKTERAN HEWAN  
UNIVERSITAS BRAWIJAYA  
MALANG  
2018**

## LEMBAR PENGESAHAN SKRIPSI

**Pengaruh Preventif Ekstrak *Green Coffee Robusta* (*Coffea canephora*)  
Terhadap Gambaran Histopatologi Gastrium dan Aktivitas  
Protease pada Tikus Putih (*Rattus norvegicus*)  
Gastroenteritis Bakterial**

**Oleh :  
ANGANTI SOTYO AYU HARINDRI  
145130100111032**

Setelah dipertahankan di depan Majelis Penguji  
pada tanggal 3 Agustus 2018  
dan dinyatakan memenuhi syarat untuk memperoleh gelar  
Sarjana Kedokteran Hewan

Pembimbing I

Pembimbing II

**Dr. Sri Murwani, drh., MP**  
NIP. 19630101 198903 2 001

**drh. Dian Vidiastuti, M. Si**  
NIP. 19820207 200912 2 003

Mengetahui,  
Dekan Fakultas Kedokteran Hewan  
Universitas Brawijaya

**Prof. Dr. Aulanni'am, drh., DES**  
NIP. 19600903 198802 2 001

## LEMBAR PERNYATAAN

Saya yang bertanda tangan di bawah ini :

Nama : Anganti Sotyo Ayu Harindri

NIM : 145130100111032

Program Studi : Pendidikan Dokter Hewan

Penulis Skripsi berjudul:

Pengaruh Preventif Ekstrak *Green Coffee Robusta (Coffea canephora)* Terhadap Gambaran Histopatologi Gastrium dan Aktivitas Protease Pada Tikus Putih (*Rattus Norvegicus*) Gastroenteritis Bakterial

Dengan ini menyatakan bahwa:

1. Isi dari skripsi saya buat adalah benar-benar karya saya sendiri dan tidak menjiplak karya orang lain, selain nama-nama yang termaktub di isi dan tertulis di daftar pustaka dalam skripsi ini.
2. Apabila dikemudian hari ternyata skripsi yang saya tulis terbukti hasil jiplakan, maka saya akan bersedia menanggung segala resiko yang akan saya terima.

Demikian pernyataan ini dibuat dengan segala kesadaran.

Malang, 03 Agustus 2018  
Yang menyatakan,

Anganti Sotyo Ayu Harindri  
NIM. 145130100111032



**PENGARUH PREVENTIF EKSTRAK *GREEN COFFEE* ROBUSTA  
(*Coffea canephora*) TERHADAP GAMBARAN HISTOPATOLOGI  
GASTRIUM DAN AKTIVITAS PROTEASE PADA TIKUS  
PUTIH (*Rattus norvegicus*) GASTROENTERITIS  
BAKTERIAL**

**ABSTRAK**

Gastroenteritis adalah kondisi radang yang menyebabkan kerusakan pada permukaan jaringan gastrium dan usus. Salah satu penyebab utama gastroenteritis yaitu bakteri *Escherichia coli*. Ekstrak *green coffee* robusta berpotensi sebagai alternatif preventif dari gastroenteritis bakterial karena memiliki kandungan polifenol berupa *chlorogenic acid* (CGA). CGA berfungsi sebagai antiinflamasi, antioksidan dan antimikroba. Tujuan dari penelitian ini yaitu mempelajari pengaruh preventif ekstrak *green coffee* robusta terhadap aktivitas protease dan gambaran histopatologi organ gastrium pada tikus yang mengalami gastroenteritis bakterial. Penelitian bersifat eksperimental menggunakan Rancangan Acak Lengkap (RAL), dengan menggunakan tikus putih (*Rattus norvegicus*) jantan usia 8-10 minggu dengan rerata BB 150-200 gram yang dibagi menjadi 5 kelompok: kelompok 1 (kontrol negatif), kelompok 2 (kontrol positif yang diberi imunosupresan dosis 5 mg/kgBB intraperitoneal (IP) *b.d.d* selama 3 hari dan 1 ml *E. coli*  $3 \times 10^8$  CFU selama 7 hari) serta kelompok terapi (kelompok 3, 4, 5) yang diberi ekstrak *green coffee* robusta dosis 500, 1000 dan 1500 mg/kgBB selama 14 hari, imunosupresan, dan *E. coli*. Imunosupresan seperti dexamethasone diberikan untuk menekan sistem imun pada tikus. Parameter berupa histopatologi gastrium diberi pewarnaan Hematoxyline-Eosin dan dianalisa secara kualitatif deskriptif, sedangkan aktivitas protease gastrium diukur menggunakan spektrofotometri UV-Vis, yang selanjutnya dimasukkan dalam rumus Walter dan dianalisa secara kuantitatif dengan *One Way ANOVA* ( $\alpha=0,05$ ). Hasil penelitian menunjukkan adanya perbaikan gambaran histopatologi gastrium tikus pada dosis 1500 mg/kgBB, namun dosis perlakuan yang digunakan belum mampu menurunkan aktivitas protease gastrium secara signifikan ( $P>0,05$ ). Kesimpulan dari penelitian ini menunjukkan bahwa ekstrak *green coffee* robusta dapat digunakan sebagai preventif terhadap gastroenteritis bakterial.

**Kata Kunci :** *Escherichia coli*, gastroenteritis, ekstrak *green coffee* robusta, histopatologi gastrium, aktivitas protease.

**PREVENTIVE EFFECT OF ROBUSTA GREEN COFFEE  
(*Coffea canephora*) EXTRACT TOWARDS GASTRIUM  
HISTOPATHOLOGY AND PROTEASE ACTIVITY  
ON RATS (*Rattus norvegicus*) INFECTED BY  
BACTERIAL GASTROENTERITIS**

**ABSTRACT**

Gastroenteritis is an inflammatory condition that can cause damage to the gastric and intestine surface. One of the main causes of gastroenteritis is *Escherichia coli* bacteria. Robusta green coffee extract can be an alternative to prevent bacterial gastroenteritis because it has polyphenol that contains Chlorogenic Acid (CGA), which acts as anti-inflammatory, antioxidant and antimicrobial. The purpose of this research was to find out the preventive effect of robusta green coffee extract on protease activity and histopathology image of rat's gastric infected by bacterial gastroenteritis. This experimental research used completely randomized experimental design and male white rats (*Rattus norvegicus*) aged 8-10 weeks with average weight of 150-200 gram that divided into five groups: group 1 (negative control), group 2 (positive control that was given immunosuppressant with dose of 5 mg/kg body weight via intraperitoneal (IP) b.i.d for three days and 1 ml *E. coli*  $3 \times 10^8$  CFU for seven days) and therapy group (3,4,5) that was given robusta green coffee extract with gradual doses of 500, 1000, and 1500 mg/kg body weight for 14 days, immunosuppressant, and 1 ml of *E.coli*. Histopathology appearance of the gastric organ was stained with Hematoxyline-Eosin and was analyzed qualitative-descriptively. Gastric protease activity was measured by UV-Vis spectrophotometry, which further incorporated into Walters's formula and was analyzed quantitatively using One Way ANOVA ( $\alpha=0,05$ ) method. The result of the research showed an improvement of histopathological features of rat's gastric at dose of 1500 mg/kg body weight, but the treatment doses were not able to significantly decrease protease activity in gastric ( $p>0,05$ ). In conclusion of this study, robusta green coffee extract can be used to prevent bacterial gastroenteritis.

**Keywords :** *Escherichia coli*, gastroenteritis, green coffee robusta extract, gastric histopathology, protease activity.

## KATA PENGANTAR

Puji syukur tak hentinya dipanjatkan kepada Tuhan Yang Maha Esa karena atas rahmat-Nya kegiatan penulisan Tugas Akhir ini dapat dilaksanakan dengan lancar. Kegiatan penulisan Tugas Akhir juga berhasil dijalankan karena bantuan dari banyak pihak, maka dari itu penulis mengucapkan terima kasih kepada :

1. Dosen pembimbing satu penulis yaitu Dr. Sri Murwani, drh., MP beserta dosen pembimbing dua penulis yaitu drh. Dian Vidiastuti, M.Si yang telah meluangkan waktu dalam membimbing, mengoreksi dan menjadi panutan bagi penulis.
2. Dosen penguji satu penulis yaitu drh. Aldila Noviatry, M. Biomed beserta dosen penguji dua penulis yaitu drh. Indah Amalia Amri, M. Si yang telah meluangkan waktunya sebagai dosen penguji pada ujian Tugas Akhir serta memberikan koreksi yang berharga bagi penulis.
3. Prof. Dr. Aulanni'am, drh., DES selaku dekan Fakultas Kedokteran Hewan Universitas Brawijaya, Malang.
4. Ibu Satindri Setyo Palupi serta bapak Hari Santoso selaku orangtua penulis yang telah senantiasa mendoakan kelancaran kegiatan penulisan Tugas Akhir.
5. Teman – teman penulis yaitu anis, nana, ila, selga, dan yasmin yang sudah memberikan asupan semangat bagi penulis serta teman kelas 2014 C atas pengalaman, dan dukungannya.
6. Pihak yang secara tidak langsung membantu kelancaran dari penulisan Tugas Akhir.

Penulis menyadari bahwa penulisan skripsi ini masih jauh dari kata sempurna, sehingga saran dan kritik yang membangun dari semua pihak sangat diharapkan oleh penulis. Penulis berharap skripsi ini dapat bermanfaat dalam menambah wawasan bagi penulis serta pembaca.

Malang, 11 Januari 2018

Penulis



## DAFTAR ISI

	Halaman
<b>HALAMAN JUDUL .....</b>	<b>i</b>
<b>HALAMAN PENGESAHAN .....</b>	<b>ii</b>
<b>HALAMAN PERNYATAAN.....</b>	<b>iii</b>
<b>ABSTRAK .....</b>	<b>iv</b>
<b>ABSTRACT .....</b>	<b>v</b>
<b>KATA PENGANTAR.....</b>	<b>vi</b>
<b>DAFTAR ISI.....</b>	<b>vii</b>
<b>DAFTAR TABEL.....</b>	<b>ix</b>
<b>DAFTAR GAMBAR.....</b>	<b>x</b>
<b>DAFTAR LAMPIRAN .....</b>	<b>xi</b>
<b>DAFTAR SINGKATAN DAN LAMBANG. ....</b>	<b>xii</b>
<b>BAB 1. PENDAHULUAN. ....</b>	<b>1</b>
1.1 Latar Belakang .....	1
1.2 Rumusan Masalah .....	2
1.3 Batasan Masalah .....	3
1.3 Tujuan Penelitian .....	4
1.4 Manfaat Penelitian .....	4
<b>BAB 2. TINJAUAN PUSTAKA .....</b>	<b>5</b>
2.1 Gastrium.....	5
2.2 Gastroenteritis .....	7
2.3 Bakteri <i>Escherichia coli</i> .....	9
2.4 <i>Bristol Stool Chart</i> .....	9
2.5 Enzim Protease.....	11
2.5.1 Enzim Protease Sel Radang .....	15
2.5.2 Enzim Protease Bakterial .....	15
2.6 Kopi.....	13
2.7 Dexamethasone .....	15
2.8 Tikus ( <i>Rattus norvegicus</i> ) .....	15
2.7.8 Tikus sebagai hewan model gastroenteritis bakterial .....	15
<b>BAB 3. KERANGKA KONSEPTUAL .....</b>	<b>17</b>
3.1 Kerangka Konsep .....	17
3.2 Hipotesis Penelitian .....	19
<b>BAB 4. METODE PENELITIAN .....</b>	<b>20</b>
4.1 Waktu dan Tempat Penelitian .....	20
4.2 Alat dan Bahan Penelitian.....	20
4.2.1 Alat.....	20
4.2.2 Bahan .....	20
4.3 Rancangan Penelitian.....	21
4.4 Variabel Penelitian .....	22
4.5 Prosedur Kerja .....	22
4.5.1 Pembuatan Ekstrak <i>Green Coffee</i> Robusta .....	22
4.5.2 Pemberian Preventif Ekstrak <i>Green Coffee</i> .....	23

4.5.3 Pembuatan suspensi <i>Escherichia coli</i> .....	23
4.5.4 Pembuatan Hewan Model Gastroenteritis Bakterial .....	24
4.5.5 Pengambilan Organ Gastrium Hewan Coba .....	24
4.6 Pengukuran Enzim Protease .....	24
4.7 Pembuatan Preparat Histopatologi Gastrium .....	25
4.8 Analisa Data .....	27
<b>BAB 5. HASIL DAN PEMBAHASAN. ....</b>	<b>29</b>
5.1 Hasil Pra-penelitian .....	29
5.1 Hasil Deteksi CGA .....	30
5.1 Hasil Induksi <i>Escherichia coli</i> .....	30
5.1 Pengaruh Preventif Ekstrak <i>Green Coffee Robusta (Coffea canephora)</i> terhadap Gambaran Histopatologi Gastrium Hewan Tikus yang Diinduksi Gastroenteritis Bakterial .....	31
5.2 Pengaruh Preventif Ekstrak <i>Green Coffee Robusta (Coffea canephora)</i> terhadap Aktivitas Protease Gastrium Hewan Tikus yang Diinduksi Gastroenteritis Bakterial .....	43
<b>BAB 6. PENUTUP. ....</b>	<b>53</b>
6.1 Kesimpulan .....	53
6.2 Saran .....	53
<b>DAFTAR PUSTAKA .....</b>	<b>29</b>
<b>LAMPIRAN .....</b>	<b>34</b>

## DAFTAR TABEL

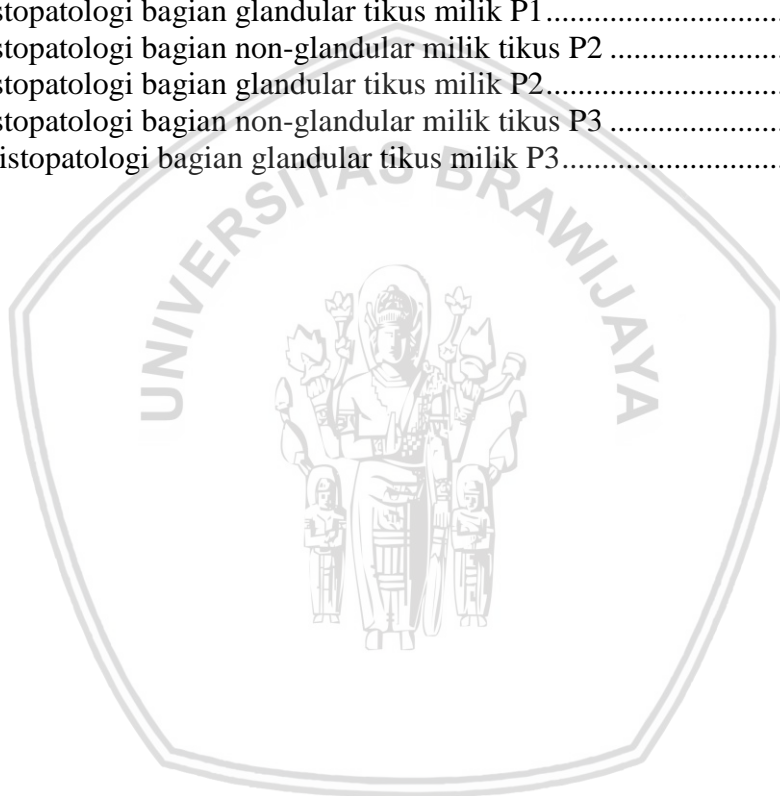
<b>Tabel</b>	<b>Halaman</b>
2.1 Data biologis tikus .....	6
2.2 Perbandingan morfologi gastrium tikus dan manusia.....	10
2.3 Kandungan kimia yang terdapat pada biji kopi arabika dan robusta .....	14
4.1 Rancangan Kelompok Penelitian .....	21





## DAFTAR GAMBAR

Gambar	Halaman
2.1 Gastrium tikus ( <i>Rattus norvegicus</i> ).....	5
2.2 Histologi organ gastrium.....	6
2.3 Tikus ( <i>Rattus norvegicus</i> ) galur Wistar .....	15
5.1.1 Histopatologi bagian non-glandular milik tikus kontrol negatif.....	30
5.1.2 Histopatologi bagian glandular milik tikus kontrol negatif .....	31
5.1.3 Histopatologi bagian non-glandular milik tikus kontrol positif.....	32
5.1.4 Histopatologi bagian glandular milik tikus kontrol positif .....	33
5.1.5 Histopatologi bagian non-glandular milik tikus P1 .....	34
5.1.6 Histopatologi bagian glandular tikus milik P1 .....	35
5.1.7 Histopatologi bagian non-glandular milik tikus P2 .....	37
5.1.8 Histopatologi bagian glandular tikus milik P2.....	38
5.1.9 Histopatologi bagian non-glandular milik tikus P3 .....	39
5.1.10 Histopatologi bagian glandular tikus milik P3.....	40



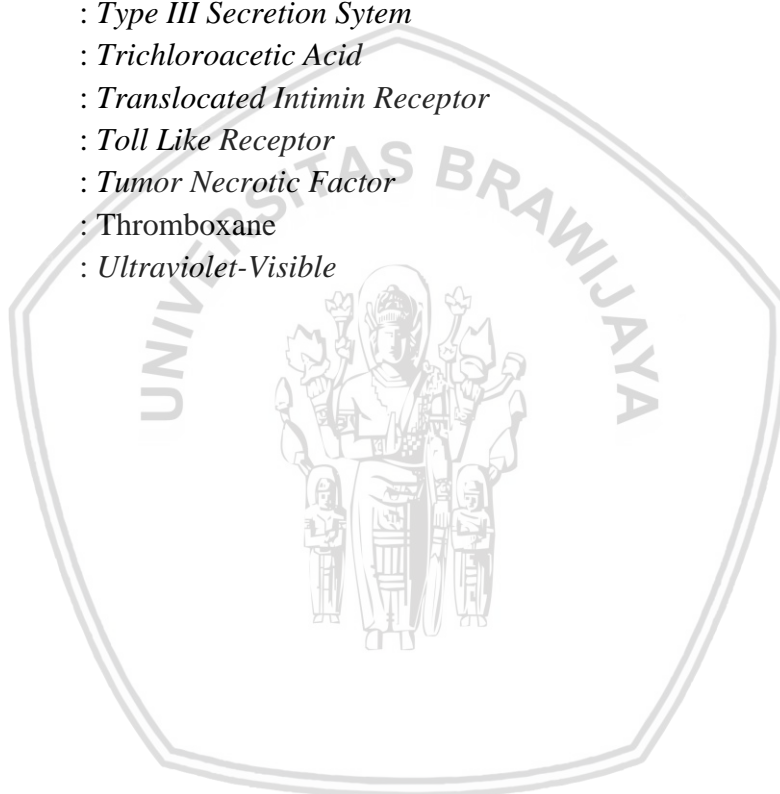
## DAFTAR LAMPIRAN

Lampiran	Halaman
1. Sertifikat Layak Etik .....	50
2. Determinasi Kopi Robusta .....	51
3. Surat Keterangan Ekstrak Tumbuhan Kopi .....	52
4. Hasil Uji LC-MS .....	53
5. Perhitungan Konversi Dosis dari Mencit ke Tikus .....	54
6. Tabel Konversi Dosis .....	55
7. Skema Penelitian .....	56
8. Hasil Pengukuran Aktivitas Protease .....	57
9. Data Statistik Aktivitas Protease .....	59
10. Diagram Kerja Pengukuran Aktivitas Protease .....	60
11. Komposisi larutan dalam Uji Aktivitas Protease .....	63
12. Tahapan Perhitungan Aktivitas Protease .....	64
13. Dokumentasi .....	67
14. Tabel Berat Badan Tikus .....	70
15. Pengenceran Ekstrak <i>Green Coffee Robusta</i> .....	71

## DAFTAR SINGKATAN DAN LAMBANG

µm	: mikrometer
°C	: derajat celcius
ANOVA	: <i>Analysis of Variance</i>
<i>b.i.d</i>	: <i>bis de die</i>
BB	: berat badan
CD	: <i>Cluster Differentiation</i>
CFU	: <i>Colony Factor Unit</i>
CGA	: <i>Chlorogenic acid</i>
cm	: sentimeter
COX	: <i>Cyclooxygenase</i>
<i>E. coli</i>	: <i>Escherichia coli</i>
EPEC	: <i>Enteropathogenic Escherichia coli</i>
EspC	: <i>E. coli secreted protein C</i>
gr	: gram
HCl	: hydrochloride
HE	: <i>Hematoxylene Eosin</i>
HPLC	: <i>High Performance Liquid Chromatography</i>
IL	: Interleukin
iNOS	: <i>Inducible Nitric Oxide Synthase</i>
IP	: intraperitoneal
kg	: kilogram
LBP	: <i>Lipopolysaccharide Binding Protein</i>
LPS	: <i>Lipopolisakarida/Lipopolysaccharide</i>
LT	: Leukotrien
MD	: <i>Myeloid Differentiation Factor</i>
mg	: miligram
MIPA	: Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam
ml	: mililiter
MMP	: Matrix Metalloprotease
NaCl	: Natrium klorida
NF-kB	: <i>Nuclear Factor-Kappa B</i>
NleC	: <i>Non-LEE-encoded C</i>
NleD	: <i>Non-LEE-encoded D</i>
nm	: nano meter
NO	: Nitric oxide
OmpT	: <i>Outer membran protein T</i>
PAF	: <i>Platelete Activating Factor</i>
PBS	: <i>Phospate Buffered Saline</i>
PFA	: <i>Paraformaldehyde</i>

PG	: Prostaglandin
pH	: <i>Power of Hydrogen</i>
PLA <sub>2</sub>	: Phospolipase A <sub>2</sub>
PMN	: Polimorfonuklear
PMSF	: <i>Phenylmethane sulfonyl fluoride</i>
PO	: Per oral
PT	: Perseroan Terbatas
RAL	: Rancangan Acak Lengkap
RIL	: <i>Rabbit Ileal Loop</i>
ROS	: <i>Reactive Oxygen Species</i>
rpm	: <i>Revolutions per minute</i>
T3SS	: <i>Type III Secretion Sytem</i>
TCA	: <i>Trichloroacetic Acid</i>
Tir	: <i>Translocated Intimin Receptor</i>
TLR	: <i>Toll Like Receptor</i>
TNF	: <i>Tumor Necrotic Factor</i>
TX	: Thromboxane
UV-Vis	: <i>Ultraviolet-Visible</i>



## BAB 1 PENDAHULUAN

### 1.1 Latar Belakang

Tanaman kopi di Indonesia mulai ditanam pada tahun 1696 oleh pemerintah Hindia Belanda, dan saat ini produksi kopi di Indonesia didominasi oleh kopi jenis robusta sebanyak 90% dan 10% sisanya adalah jenis arabika, liberika dan lainnya. Dominasi jenis robusta di Indonesia diakibatkan oleh sifat ketahanannya terhadap penyakit karat daun (Rahardjo, 2012).

Biji kopi dari jenis robusta (*Coffea canephora*) mengandung kafein, polifenol, protein, lipid, dan garam mineral. Komponen fenol pada biji kopi terdiri atas *gallic acid*, *chlorogenic acid* (CGA) atau asam klorogenat, catehin, *caffeic acid*, vanillin, epicatehin dan *ferulic acid*. CGA menjadi komponen fenol yang paling dominan pada biji kopi. Kadar CGA pada biji kopi robusta dapat menurun dari kisaran 6,1-11,3 g/100g menjadi sekitar 3,3-3,8 g/100g akibat hidrolisa CGA saat proses penyangraian atau pemanggangan biji kopi. Kopi yang telah dikupas dan belum mengalami proses penyangraian sering disebut sebagai kopi hijau atau *green coffee*. Kandungan CGA pada biji kopi termasuk yang paling tinggi dibanding dengan CGA yang terkandung dalam tanaman lain. CGA diketahui memiliki beberapa efek farmakologis yaitu sebagai antivirus hepatitis B, antihipertensi, antidiabetes, antioksidan, hepatoprotektor dan mampu digunakan secara preventif pada kondisi inflamasi organ intestinal. CGA bekerja dengan menghambat produksi NO, menurunkan ekspresi COX-2 dan iNOS tanpa mengakibatkan sitotoksitas,

menurunkan jumlah sitokin proinflamasi dan menghambat NF-kB (Kreicbergs *et al.*, 2011; Farah, 2012; Farah and Carmen, 2006; Farah *et al.*, 2005; Rahardjo, 2012; Farhaty dan Muchtaridi, 2017; Shin *et al.*, 2015; Hwang, 2014).

Gastroenteritis merupakan kondisi inflamasi pada membran mukosa gastrium dan usus dengan gejala klinis berupa muntah serta diare akibat hilangnya cairan elektrolit sehingga terjadi gangguan keseimbangan elektrolit dan dehidrasi. Kasus gastroenteritis pada hewan dapat ditemukan pada penyakit kolibasilosis yang disebabkan oleh bakteri *E. coli*. Kolibasilosis mampu menyerang hewan unggas dan ternak. Kolibasilosis banyak ditemukan menginfeksi hewan usia muda. Sepanjang tahun 2010, penyakit yang berdampak pada saluran pencernaan ayam ditemukan cukup tinggi (15,31% pada ayam pedaging dan 7,84% pada ayam petelur). Pada anak sapi, angka morbiditas dan mortalitas akibat diare mencapai 39%, dimana faktor penyebab terbanyak disebabkan oleh bakteri *E. coli* (Betz, 2002; Info Medion, 2011; Pudjiatmoko dkk, 2014; Chotiah, 2012).

Bakteri *E. coli* yang merupakan bakteri gram negatif menghasilkan endotoksin berupa LPS (lipopolisakarida). LPS menginduksi inflamasi yang mengakibatkan sel imun menghasilkan enzim protease. Selain itu, bakteri *E. coli* mengandung enzim protease yang dapat mengganggu fisiologis dari hospes. Akumulasi enzim protease dari sel imun dari organ gastrium serta bakteri *E. coli* mengakibatkan tingginya kadar enzim protease tubuh sehingga mampu menginduksi kerusakan jaringan. Pemberian *green coffee* robusta

yang mengandung CGA, mampu menghambat respon inflamasi yang diakibatkan oleh LPS milik bakteri gram negatif (Braude *et al.*, 1986; Abbas and Litchman, 2005; Budiarti dan Mubarik, 2007; Shan *et al.*, 2009).

Penelitian mengenai kopi selama ini hanya berfokus pada kandungan kafein pada kopi yang menyebabkan potensi dari senyawa bermanfaat lain pada kopi tidak banyak diketahui masyarakat. Pemberian *green coffee* robusta yang memiliki kandungan CGA tinggi pada tikus terinfeksi bakteri *E. coli*, diharapkan dapat menghambat produksi NO, menurunkan ekspresi COX-2 dan iNOS tanpa mengakibatkan sitotoksitas, dan menurunkan jumlah sitokin proinflamasi sehingga aktivitas protease diharapkan menurun dan kerusakan jaringan gastrium dapat ditekan. Tingkat kerusakan jaringan di organ gastrium dapat diamati melalui preparat histopatologi gastrium.

## 1.2 Rumusan Masalah

1. Apa pengaruh pemberian preventif ekstrak *green coffee* robusta (*Coffea canephora*) terhadap gambaran histopatologi gastrium hewan model tikus putih (*Rattus norvegicus*) yang mengalami gastroenteritis?
2. Apa pengaruh pemberian preventif ekstrak *green coffee* Robusta (*Coffea canephora*) terhadap tingkat aktivitas protease pada organ gastrium hewan model tikus putih (*Rattus norvegicus*) yang mengalami gastroenteritis?

## 1.3 Batasan Masalah

1. Hewan coba yang digunakan adalah tikus putih (*Rattus norvegicus*) jantan usia 8-10 minggu dengan berat 150-200 gram (Gani dkk, 2013). Tikus diberi minum berupa air mineral secara *ad libitum* dan pakan tikus standar



berupa BR-1. Pakan tikus diberikan sebanyak 10% dari berat badan (Upadkk, 2017). Penelitian dilaksanakan di Laboratorium Mikrobiologi Fakultas Kedokteran Hewan dan Laboratorium Biokimia Fakultas MIPA Universitas Brawijaya.

2. Konsistensi ekstrak biji *green coffee* robusta (*Coffea canephora*) berupa cairan. Pemberian ekstrak sebagai preventif diberikan dengan dosis 50-250 mg/kg BB pada mencit (Haque *et al.*, 2013). Penghitungan dosis pada tikus menggunakan tabel konversi Paget and Barnes dalam Laurence and Bacharach (1964), sehingga didapat dosis 500 mg/kgBB, 1000 mg/kgBB, dan 1500mg/kgBB dengan mencampur ekstrak dengan aquades hingga didapat volume total 2 ml. Selama 14 hari sebelum makan, ekstrak diberikan menggunakan sonde lambung sebanyak satu kali sehari (Setyono dkk, 2014). Biji kopi robusta telah mendapat surat keterangan determinasi dari UPT Materia Medika Kota Batu (Lampiran 4).
3. Kopi hijau yang digunakan yaitu bagian biji kopi robusta yang telah dikupas dan belum mengalami proses penyangraian. Buah kopi dianggap masak antara minggu ke-28 hingga minggu ke-34 pasca mekarnya bunga kopi (Rahardjo, 2017).
4. Pemberian imunosupresan berupa Dexamethasone dengan dosis 5 mg/kg BB sebanyak dua kali sehari selama 3 hari secara IP (Sulaiman *et al.*, 2010).
5. Pemberian larutan bakteri *Escherichia coli* sebanyak 1 ml selama 7 hari menggunakan sonde lambung (Astawan dkk, 2011).

6. Aktivitas protease merupakan banyaknya mikro mol ( $\mu\text{mol}$ ) tirosin yang dihasilkan dari hidrolisa ikatan peptida pada kasein oleh enzim protease hasil isolasi dari organ gastrium pada kondisi optimum yaitu suhu  $37^{\circ}\text{C}$ , pH 6,5, dan waktu inkubasi 60 menit (Ranuh, 2008). Aktivitas protease yang diamati merupakan protease milik gastrium serta bakteri *E.coli* (Abbas and Litchman, 2005; Budiarti dan Mubarik, 2007) Aktivitas protease dianalisa dengan metode Walter menggunakan spektrofotometri dengan panjang gelombang maksimum 275 nm. Nilai absorbansi protease dimasukkan ke dalam persamaan kurva baku tirosin untuk mendapatkan nilai tirosin yang terbentuk pada reaksi enzimatik (Bergmeyer, 2012).
7. Gastrium diamati secara mikroskopis menggunakan preparat histopatologi yang diberi pewarnaan Hematoxyline-Eosin. Pengamatan dilakukan menggunakan mikroskop cahaya (Pasaribu dkk, 2013).

#### 1.4 Tujuan Penelitian

1. Mengetahui potensi pemberian preventif ekstrak *green coffee* robusta (*Coffea canephora*) terhadap perbaikan gambaran histopatologi pada organ gastrium hewan model tikus putih (*Rattus norvegicus*) yang mengalami gastroenteritis
2. Mengetahui potensi pemberian preventif ekstrak *green coffee* robusta (*Coffea canephora*) terhadap penurunan aktivitas protease pada organ gastrium hewan model tikus putih (*Rattus norvegicus*) yang mengalami gastroenteritis

#### 1.5 Manfaat Penelitian

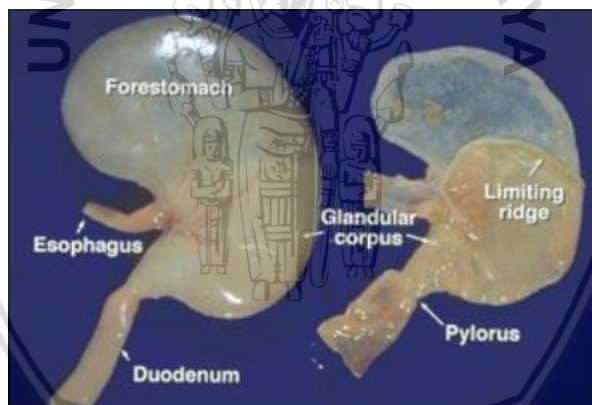
Penelitian ini dapat digunakan sebagai sumber literatur bagi penelitian lebih lanjut akan potensi pemberian secara preventif ekstrak *green coffee* robusta (*Coffea canephora*) pada kasus gastroenteritis bakterial.



## BAB 2 TINJAUAN PUSTAKA

### 2.1 Gastrium

Gastrium merupakan bagian dari saluran pencernaan yang terletak diantara organ esophagus dan duodenum. Gastrium memiliki beberapa peranan dalam proses pencernaan yaitu sebagai tempat menampung makanan untuk selanjutnya diteruskan menuju duodenum, mensekresikan asam lambung dan enzim proteolitik guna menginisiasi digesti protein, menetralsir beberapa bakteri patogen yang berasal dari makanan dan berperan dalam mengolah makanan menjadi *chyme* (Mahadevan, 2014).



**Gambar 2.1** Gastrium tikus (*Rattus norvegicus*) (Vinerean, 2017)

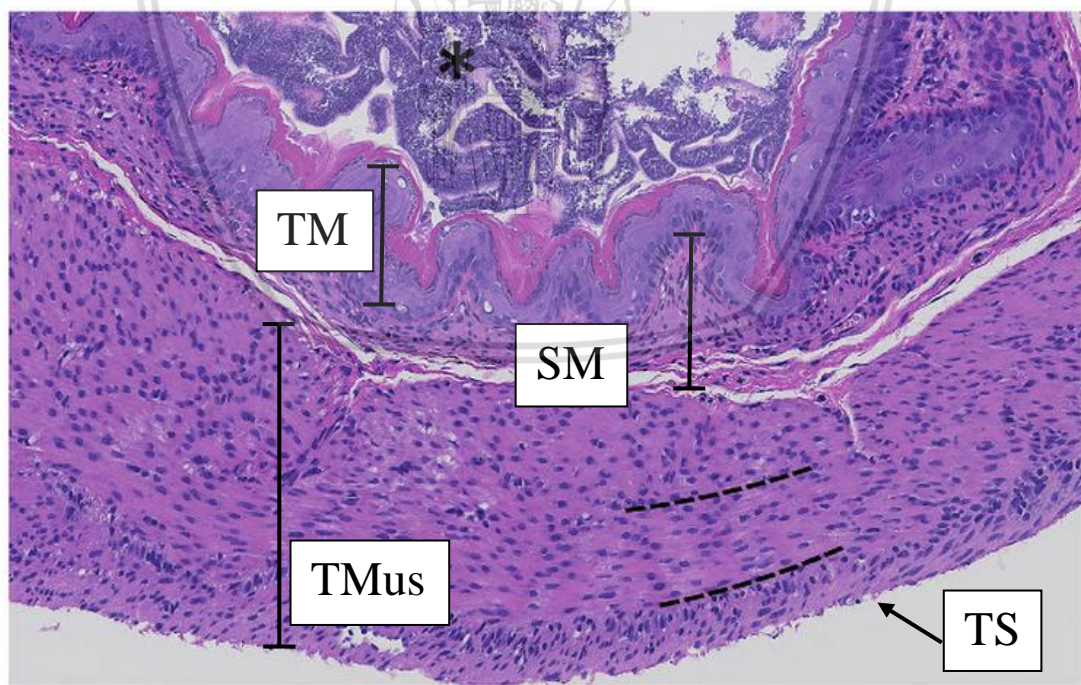
Secara umum gastrium mamalia dapat dibagi menjadi empat bagian yaitu cardia, fundus, corpus, dan pylorus. Pada gastrium terdapat inervasi dari cabang arteri celiaca (Ellis, 2011). Gastrium tikus terbagi atas gastrium non-glandular dan gastrium glandular. Bagian non-glandular menyusun tiga perlima bagian dari gastrium (Matsukura *et al.*, 1997).

Bagian perbatasan antara non-glandular dengan glandular corpus disebut *limiting ridge*. *Limiting ridge* merupakan garis yang terbentuk di dalam permukaan organ gastrium, yang nampak mengalami transisi dari epitel squamous berkeratin yang dimiliki non-glandular dengan epitel kolumnar simplek pada glandular corpus. Tonjolan pada *limiting ridge* disebabkan oleh penebalan bagian lamina muskularis mukosa (Luciano *and* Reale, 1992).

**Tabel 2.1** Perbandingan morfologi gastrium tikus dan manusia

Gastrium tikus	Gastrium manusia
Organ berbentuk semilunar	Organ berbentuk pir
Membran mukosa terdiri atas dua bagian yaitu glandular dan nonglandular	Membran mukosa hanya terdiri atas bagian glandular
Berat 1, 8% dari total berat tubuh	Berat 6, 2% dari total berat tubuh
Trunkus celiaca panjang	Trunkus celiaca pendek

Sumber : (Vdoviaková, 2016).



**Gambar 2.2** Histologi organ gastrium tikus bagian glandular. TM= tunika mukosa, SM= muskularis mukosa, TMus= tunika muskularis, TS= tunika serosa (Parker *and* Picut, 2016)



Secara mikroskopis organ tubuler yang diamati memiliki empat lapisan penyusun yang disebut tunika. Urutan lapisan dari permukaan luminal hingga perifer yaitu tunika mukosa, tunika submukosa, tunika muskularis dan tunika adventisia/serosa. Tunika mukosa terdiri atas tiga lamina yaitu lamina epitelialis mukosa, lamina propia mukosa dan lamina muskularis mukosa. Epitel permukaan dapat ditemukan pada lamina epitelialis mukosa. Lamina propria mukosa tersusun atas jaringan ikat longgar kolagen dan retikuler. Lamina muskularis mukosa tersusun atas satu atau lebih lapisan otot polos. Pada tunika submukosa terdapat jaringan ikat, pembuluh darah besar, nervus, dan plexus. Tunika muskularis umumnya tersusun atas dua lapis otot polos. Tunika adventisia atau serosa tersusun atas jaringan ikat longgar kolagen (Banks, 1993).

## 2.2 Gastroenteritis

Gastroenteritis merupakan radang pada saluran pencernaan yang disebabkan oleh infeksi, dengan gejala seperti muntah, dehidrasi dan diare (Cakrawardi dkk, 2011). Inflamasi digolongkan akut pada gastrointestinal, jika terjadi radang dalam kisaran waktu antara jam hingga hari akibat paparan dari pemicu gastroenteritis. Karakteristik pada gastroenteritis akut yaitu terjadinya vasodilatasi, edema jaringan, eksudasi protein, eksositosis neutrofil dan dilepaskannya mediator inflamasi. Lain halnya dengan inflamasi akut, inflamasi kronis terjadi jika saluran cerna terkena paparan pemicu gastroenteritis dalam jangka waktu minggu hingga bulan. Ciri dari inflamasi kronis adalah infiltrasi dari sel radang dan produksi mediator pro-inflamasi. Respon pada inflamasi kronis

dapat menggabungkan antara nekrosis jaringan dan perbaikan jaringan yang melibatkan *stromal growth factor*, *matrix metalloproteinase*, *inhibitor matrix metalloproteinase*, dan proses pembentukan jaringan granulasi dan fibrosis (Washabau and Day, 2012).

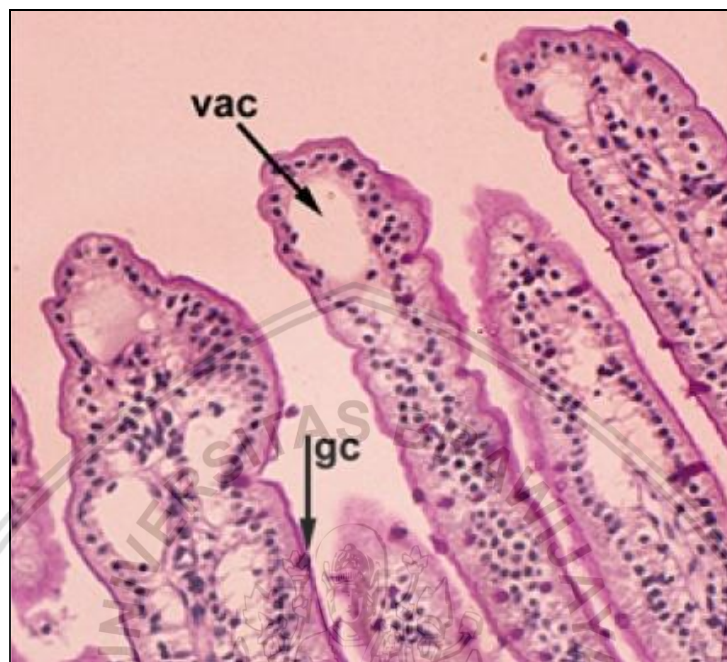
Diare merupakan salah satu dari gejala gastroenteritis. Diare merupakan kumpulan dari gejala infeksi saluran cerna yang disebabkan oleh beberapa mikroorganisme seperti bakteri, virus, dan parasit. Bakteri seperti *Escherichia coli*, *Shigella*, *Campylobacter*, *Salmonella* dan *Vibrio cholera* merupakan salah satu penyebab epidemi diare pada anak. Diare cair pada anak sebagian besar disebabkan oleh infeksi rotavirus, *Vibrio cholera* dan *Escherichia coli*. Pada tahun 2007 di Indonesia, diare menjadi penyebab utama kematian pada anak (Soenarto, 2011).

Kolibasilosis adalah penyakit infeksius yang diakibatkan oleh bakteri *E. coli* patogen sebagai agen primer maupun sekunder. Kolibasilosis dapat terjadi pada ayam pedaging dan petelur pada semua usia, serta unggas lain seperti kalkun dan itik. Penularan kolibasilosis dapat terjadi secara oral melalui pakan, air minum, debu atau kotoran yang tercemar *E. coli*. Manifestasi kolibasilosis dapat berupa septikemia, enteritis, omphalitis, arthritis, peritonitis, dan bursitis sternalis. Secara normal bakteri *E. coli* terdapat di dalam saluran pencernaan ayam seperti jejunum, ileum dan sekum (Tarmudji, 2003).

Bakteri *E. coli* menginfeksi jaringan dengan cara yang berbeda tergantung berdasarkan patotipenya, karena tiap patotipe dari bakteri *Escherichia coli*



memiliki karakteristik tersendiri berdasarkan jenis adhesin, toksin yang dihasilkan maupun adanya struktur T3SS (Clements *et al.*, 2012).



**Gambar 2.3** Histopatologi organ intestinal tikus yang diinfeksi bakteri *Escherichia coli*. Nampak vac=vakuolisasi dan gc=kerusakan glikokaliks (Vulcano *et al.*, 2014)

Pengamatan secara mikroskopis organ gastrium pada fase awal gastritis menunjukkan adanya perubahan seperti penurunan jumlah mucin dalam sitoplasma, sel nukleus yang membesar, dan ditemukannya satu atau lebih nucleolus yang terlihat. Peningkatan jumlah sel mitosis dapat terlihat pada bagian dasar dari *pits*. Epitel dan lamina propria diinfiltrasi oleh sel inflamasi akut. Atropi dapat terjadi pada glandula di lapisan mukosa serta peningkatan jumlah sel inflamatori dapat terlihat pada gastritis yang telah berlangsung cukup lama (Mills *et al.*, 2004).

### 2.3 Bakteri *Escherichia coli*

*Escherichia coli* merupakan bakteri gram negatif dengan morfologi berbentuk cocobasil hingga basil, yang bersifat motil karena memiliki alat gerak berupa flagella. Ukuran bakteri ini berkisar 0,5-3  $\mu\text{m}$ . Bakteri *E. coli* tidak memiliki kapsul dan tidak membentuk spora. Pada *E. coli* yang ditanam pada media agar, koloni nampak berwarna putih hingga kekuningan, bersifat *moist*, *entire* hingga *undulate*. Pada media broth, bakteri *E. coli* nampak keruh dengan sedimen berwarna keabu-abuan (Boone *et al.*, 2001)

Bakteri *E. coli* dapat mengakibatkan penyakit kolibasilosis pada hewan mamalia maupun unggas. Kolibasilosis banyak menyerang hewan berusia muda, pada hewan sapi dikenal tiga bentuk kolibasilosis yaitu enterik-toksemik kolibasilosis, septisemik kolibasilosis dan enterik kolibasilosis. Patologi jaringan secara makroskopis yang dapat diamati yaitu berupa pendarahan submukosa, gastritis maupun enteritis. Terkadang ditemukan pula eksudat berfibrin dalam sendi, dan pneumonia (Pudjiatmoko dkk, 2014).

Patogenitas mikroorganisme terdiri atas mekanisme kompleks yang beragam. Adhesi merupakan salah satu cara mikroorganisme menyerang hospes melalui perlekatan fimbriae. Pada bakteri *E. coli* terdapat banyak jenis dari adhesi fimbrial. Bakteri *E. coli* terdiri atas enam jenis yaitu *enteropathogenic E. coli* (EPEC), *enterohemorrhagic E. coli* (EHEC), *enterotoxigenic E. coli* (ETEC), *enteroaggregative E. coli* (EAEC), *enteroinvasive E. coli* (EIEC) dan *diffusely adhering E. coli* (DAEC). EPEC merupakan penyebab utama diare pada anak-anak. EPEC banyak ditemukan intestinal. Pada organ yang terinfeksi EPEC secara

mikroskopis akan nampak lesi pada sel epitel berupa *attaching and effacing* (A/E) lesi. Lesi (A/E) ditandai dengan degenerasi mikrovili pada intestinal dan munculnya bentukan pedestal pada perlekatan bakteri (Krogfelt, 1991; Torres *et al.*, 2005).

*Escherichia coli* pertama kali dianggap sebagai enteropatogen pada tahun 1945, ketika ditemukan bahwa pada strain tertentu dari *Escherichia coli* dapat berperan dalam terjadinya *outbreak* diare pada anak-anak. Strain *E. coli* yang mengakibatkan kejadian tersebut akhirnya diberi nama EPEC (*enteropathogenic E. coli*). Selanjutnya diketahui bahwa EPEC menginduksi akumulasi cairan dan mengakibatkan dilatasi RIL (*Rabbit Ileal Loop*), karena RIL lebih sensitif dibandingkan RIL pada kelinci dewasa untuk mendeteksi aktivitas enterotoksik pada EPEC (Law, 1988).

**Tabel 2.2** Rangkuman patotipe bakteri enteric *Escherichia coli*

Pathotype	Adhesin	Toxin	T3SS
<b>ETEC</b>	- <i>Colonization factors</i> (CF) - <i>Procine A/E associated adhesin</i> (Paa)	- <i>Heat-labile enterotoxin</i> (LT) - <i>Heat-stable enterotoxin</i> (ST) - Cytolysin A (ClyA)	-
<b>EAEC</b>	- <i>Aggregative adherence fimbriae</i> (AAF), (I,II,III,Hda) - <i>Toxigenic invasion loci A</i> (Tia)	- <i>EAEC heat-stable enterotoxin 1</i> (EAST1) - <i>Shigella entrotoxin</i> (ShET)1 - Hemolysin E (HlyE)	+/*
<b>DAEC</b>	- <i>Afimbrial</i> (Afa) atau <i>Fimbrial</i> (Dr) <i>adhesin</i>	-	-
<b>EHEC</b>	- Intimin - Paa - Toxin B (ToxB) - <i>Escherichia coli factor for adherence</i> (Efa)-1	Stx	LEE <i>encoded</i>

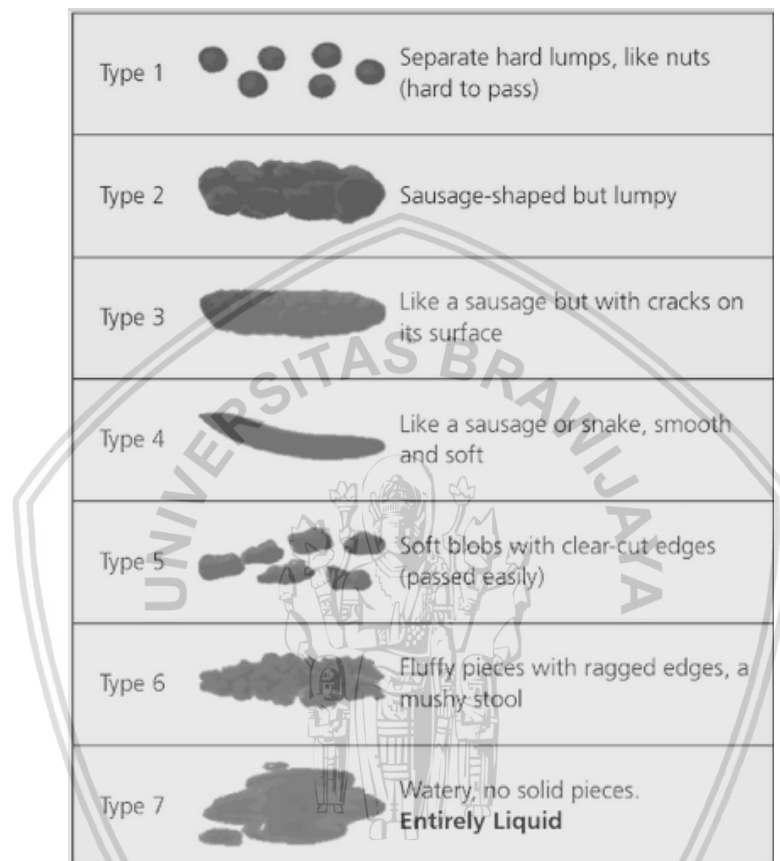
	<ul style="list-style-type: none"> <li>- LPF</li> <li>- STEC <i>autoagglutinating adhesin</i> (Saa)</li> <li>- <i>Escherichia coli</i> <i>immunoglobulin-binding protein</i> (EibG)</li> <li>- EHEC <i>autotransporter encoding gene A</i> (EhaA)</li> <li>- <i>Outer membrane protein A</i> (OmpA)</li> <li>- Iha</li> </ul>		
<b>EPEC</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- intimin</li> <li>- <i>Bundle forming pili</i> (BFP)</li> <li>- Paa</li> <li>- LPF</li> <li>- Iha</li> <li>- EhaA</li> </ul>	-	LEE <i>encoded</i>
<b>EIEC</b>	-	-	pINV <i>encoded</i>

Sumber: Clements, 2012

#### 2.4 Bristol Stool Chart

*Bristol Stool Chart* merupakan teknik untuk mengelompokkan jenis feses menjadi tujuh kategori. Tipe nomor satu dan dua mengindikasikan feses penderita konstipasi, tipe nomor tiga dan empat merupakan feses normal, dan tipe lima hingga tujuh merupakan feses yang mengarah pada kejadian diare. Feses yang termasuk dalam tipe nomor satu memiliki warna coklat tua kehitaman, bertekstur keras, terbagi menjadi beberapa bagian terpisah dan feses sulit dieksresi dari anus. Tipe nomor dua memiliki warna coklat tua, bertekstur kasar namun lebih lunak dari tipe nomor satu, struktur feses padat jadi satu. Feses nomor tiga berwarna coklat tua, bertekstur agak lunak, dan memadat jadi satu. Feses nomor empat memiliki warna coklat, bertekstur lunak dan halus. Feses nomor lima memiliki warna feses coklat muda, bertekstur lunak dan berair. Feses nomor enam memiliki

warna feses coklat muda, tekstur lunak, berair dan berlendir. Feses nomor tujuh memiliki warna coklat muda, tekstur encer dan sangat berair (Keshav *and* Kulver, 2011).



**Gambar 2.4.1** Bristol Stool Chart (Keshav *and* Kulver, 2011)

## 2.5 Enzim Protease

Enzim protease merupakan enzim yang berperan dalam reaksi pemecahan protein dengan menghidrolisa ikatan peptida pada molekul protein menjadi peptida atau asam amino. Protein terdiri atas asam amino yang jumlahnya diatas 100. Protease berperan dalam sejumlah reaksi biokimia seluler seperti degradasi protein, mekanisme patogenitas, proses koagulasi darah, proses pasca translasi protein dan mekanisme ekspresi protein ekstraseluler (Rao *et al.*, 1998).

Protease berdasarkan cara kerjanya terbagi menjadi dua yaitu proteolisis terbatas dan proteolisis tidak terbatas. Contoh proteolisis terbatas adalah perubahan prohormon menjadi hormon. Contoh proteolisis tidak terbatas yaitu degradasi protein menjadi asam amino penyusunnya. Berdasarkan letak pemutusan ikatan peptida, protease dibedakan menjadi dua yaitu endopeptidase dan eksopeptidase. Endopeptidase memutuskan ikatan peptida yang ada di dalam rantai protein sehingga dihasilkan peptida dan polipeptida. Eksopeptidase menguraikan protein dari ujung rantai yang menghasilkan satu asam amino dan sisa peptida (Palmer, 1991).

Endopeptidase terbagi menjadi empat kelompok utama yaitu protease serin, sisten, aspartate dan protease logam atau metaloprotease. Protease logam memerlukan adanya logam untuk aktivitasnya dan berperan penting dalam sel-sel fagosit seperti leukosit dan makrofag. Enzim protease adalah komponen dari sel PMN, monosit dan makrofag (Sadikin, 2002; Poliana, 2007).

### **2.5.1 Enzim Protease Sel Radang**

Matrix Metalloproteinases (MMPs) merupakan famili enzim protease yang memerlukan zinc dalam proses reaksinya. MMP terdiri atas 20 member yang terdiri atas *interstitial collagenases* (MMP-1,-2,-3), yang memecah kolagen fibrilar tipe I, II, dan III; *gelatinases* (MMP-2 dan 9), yang mendegradasi kolagen amorf, dan stromelysins (MMP-3, 10 dan 11), yang berperan pada komponen ECM seperti proteoglikan dan kolagen amorf. MMP dihasilkan oleh sel fibroblast, makrofag, neutrofil, sel sinovial dan sel epitel. Sekresi MMP diinduksi oleh *growth factor* (PDGF, FGF), sitokin (IL-1, TNF), dan fagositosis pada makrofag.



Collagenase yang aktif akibat radikal bebas dari *oxidative burst*, akan memecah kolagen yang berperan dalam proses remodeling jaringan ikat guna memperbaiki kerusakan pada jaringan. TIMPs akan dihasilkan oleh sel mesenkim sebagai regulator dari MMP (Kumar *et al.*, 2010).

Enzim elastase merupakan golongan serin protease yang dihasilkan didalam fagosom sel neutrofil yang aktif. Enzim ini berperan dalam proses membunuh bakteri. Sel radang yang teraktivasi secara berlebih dapat merusak jaringan normal hospes karena produk mikrobisidal dapat keluar menuju ekstraseluler dan mengakibatkan kerusakan jaringan. Hal ini dikarenakan produk mikrobisidal ini tidak mampu membedakan antara jaringan milik hospes dan milik mikroba. Sehingga produk seperti ROS, NO, dan enzim lisosomal mampu mengakibatkan kerusakan jaringan milik hospes. ROS dan NO berfungsi membunuh mikroba, MMP yang dihasilkan berperan dalam remodeling jaringan bersama *growth factor* seperti *fibroblast growth factor* (FGF), *angiogenic factor* (VEGF) dan TGF- $\beta$ . FGF berperan dalam proses kemotaktik dan mitogenik dari fibroblast. VEGF berperan dalam proses mitogenik sel endotel dan angiogenesis. TGF- $\beta$  berperan dalam proses remodeling dengan menyebabkan sistesis dari ekstraselular matriks protein seperti kolagen dan MMP yang dapat memicu perbaikan jaringan pasca reaksi inflamasi dapat terkontrol. MMP yang merupakan protease, jika dalam jumlah berlebih akibat proses fagositosis maka dapat mengakibatkan kerusakan jaringan. (Abbas *and* Litchman, 2005; Kumar *et al.*, 2010).



### 2.5.2 Enzim Protease Bakterial

Enzim protease juga dimiliki oleh bakteri, contohnya bakteri *Escherichia coli*. Bakteri *E. coli* strain EPEC memiliki enzim protease yang berfungsi dalam proses invasi terhadap hospes. Contoh enzim protease milik EPEC yaitu ekstraselular protease, NleC, NleD, EspC dan OmpT. Ekstraselular protease berperan dalam proses kolonisasi bakteri dengan cara menghancurkan lapisan mukus pada gastrointestinal. NleC dan NleD merupakan golongan metalloprotease yang menurunkan respon imun tubuh dengan cara mentarget NF- $\kappa$ B, JNK serta p38. EspC berperan dalam mengakibatkan apoptosis dan nekrosis akibat infeksi EPEC. OmpT (*outer membrane protease*) berperan dalam degradasi  $\alpha$ -helical AMPs (*antimicrobial peptide*) (Budiarti dan Mubarik, 2007; Clements *et al.*, 2012; Serapio-Palacio and Navarro-Garcia, 2016; Thomassin *et al.*, 2012).

### 2.6 Kopi

Indonesia di tahun 2016 merupakan negara pengekspor kopi nomor empat terbanyak di dunia setelah negara Brazil, Vietnam, dan Kolombia. Total produksi kopi di Indonesia di tahun 2015 mencapai 660.000 ton biji kopi hijau sedangkan total konsumsi kopi masyarakat di Indonesia sebanyak 252.000 ton biji kopi hijau per tahun. (ICO, 2017). Kopi hijau atau yang lebih populer dengan istilah *green coffee* merupakan kopi yang telah dikupas dan belum mengalami proses penyangraian. Kopi jenis robusta merupakan jenis kopi terbanyak yang dihasilkan di Indonesia, diikuti dengan kopi jenis arabika dan lainnya. Kopi robusta banyak ditanam di Indonesia karena jenis ini lebih tahan terhadap penyakit karat daun

akibat jamur *Hemileia vastatrix* dibanding jenis arabika, liberika dan lainnya (Rahardjo, 2012)

*green coffee* mengandung kafein, CGA, *caffeic acid*, protein, lipid, dan garam mineral. Kandungan total fenol dapat dideteksi menggunakan spektrofotometri dan kandungan tiap fenol (*gallic acid*, *caffeic acid*, catehin, vanillin, CGA, epicatehin, and *ferulic acid*) dapat diukur dengan HPLC (*High Performance Liquid Chromatography*). Jumlah konten tergantung berdasarkan varietas kopi, cara pemanenan, iklim dan cara pemrosesan. Kandungan CGA pada kopi berkisar antara 4,5-11% dari berat kopi. Pada *medium roasting* kandungan CGA berkurang sebanyak 30% dan pada *dark roast* menurun hingga 70%. Proses pemanggangan mengakibatkan perubahan komposisi kimia dan aktivitas biologi yang disebut reaksi Maillard (Kriebberg, 2011, Hecimovic *et al.*, 2011).

Kandungan asam tertinggi pada kopi adalah CGA, CGA termasuk keluarga dari ester yang terbentuk dari gabungan asam kuinat dan beberapa asam transinamat, umumnya *caffeic*, *p-coumaric* dan asam ferulat. Efek farmakologi yang telah diteliti yaitu sebagai antivirus hepatitis B, antihipertensi, antidiabetes, hepatoprotektor, dan antioksidan. Efek CGA terhadap reaksi inflamasi dan hubungannya terhadap rasa sakit dan demam belum banyak diteliti (Farhaty, 2017; Santos *et al.*, 2006).

**Tabel 2.3** Kandungan kimia yang terdapat pada biji kopi Arabika dan Robusta

Komponen	Konsentrasi (g/100g)		Konsentrasi (g/100g)	
	<i>Green coffea arabica</i>	<i>Roasted coffea arabica</i>	<i>Green coffea canephora</i>	<i>Roasted coffea canephora</i>
Sukrosa	6.0-9.0	4.2-tr	0.9-4.0	1.6-tr
Gula pereduksi	0.1	0.3	0.4	0,3
Polisakarida	34-44	31-33	48-55	37
Lignin	3.0	3.0	3.0	3.0
Pectin	3.0	2.0	.0	2.0
Protein	10.0-11.0	7.5-10	10.0-11.0	7.5-10
Asam amino bebas	0.5	Tidak terdeteksi	0.8-1.0	Tidak terdeteksi
Kafein	0.9-1.3	1.1-1.3	1.5-2.5	2.4-2.5
Trigonelin	0.6-2.0	1.2-0.2	0.6-0.7	0.7-3.0
Asam nikotinic	-	0.016-0.026	-	0.014-0.025
Minyak kopi (trigliserida)	15-17.0	17	7.0-10.0	11
Diterpen	0.5-1.2	0.9	0.2-0.8	0.2
Mineral	3.0-4.2	4.5	4.4-4.5	47
<b>CGA</b>	<b>4.1-7.9</b>	<b>1.9-2.5</b>	<b>6,1-11,3</b>	<b>3.3-3.8</b>
Asam alifatik	1.0	1.6	1,0	1.6
Asam quinic	0.4	0.8	0,4	1.0
Melanoidins	-	25	-	25

Sumber: (Farah, 2012)

Keamanan dari konsumsi kopi dibuktikan oleh kasus anafilaksis akibat konsumsi kopi yang jarang terjadi. Dua kasus anafilaktik terjadi di Jepang akibat kombinasi kafein dengan obat lain. Belum ditemukan kasus anafilaksis tunggal akibat mengonsumsi kafein saja (Sugiyama *et al.*, 2015). Alergi yang disebabkan oleh *green coffee* bukan diakibatkan oleh CGA dan isomernya, melainkan akibat kandungan protein dari *green coffee* (Layton *et al.*, 1965)

## 2.7 Dexamethasone

Dexamethasone merupakan obat golongan glucocorticoids yang digunakan sebagai terapi antiinflamasi dan immunosupresan. Dexamethasone secara luas digunakan untuk inflamasi akut maupun kronis seperti kasus rheumatoid arthritis, *inflammatory bowel disease*, sclerosis, psoriasis dan penanganan pasca transplantasi organ. Pada inflamasi, dexamethasone bekerja dengan cara menghambat vasodilatasi, meningkatkan permeabilitas vaskular, dan menurunkan kecepatan migrasi dari leukosit menuju lokasi inflamasi (Coutinho, 2011).

Secara farmakologis, dexamethasone memiliki efek yang beragam pada berbagai sistem dalam tubuh hewan. Dexamethasone di dalam sel akan menghambat proliferasi fibroblast, respon makrofag menuju faktor inhibitor. Pada saluran pencernaan glukokortikoid bekerja dengan cara mengganggu proliferasi sel, serta meningkatkan sekresi asam lambung, pepsin dan tripsin (Plumb, 2011).

Pada kasus autoimun dan pasca transplantasi, agen immunosupresan seperti golongan kortikosteroid dapat diberikan. Pemberian kortikosteroid dapat menginduksi keadaan immunosupresan dengan cara berikatan dengan reseptor glukokortikoid intraseluler dan memodulasi berbagai fungsi seluler. Fungsi seluler yang beragam, memberikan efek yang beragam pula pada sistem imun, namun keseluruhan fungsi seluler tersebut berhubungan dengan dihambatnya faktor transkripsi seperti NF-kB dan *activator protein-1* (AP-1). Saat faktor transkripsi dihambat, akan terjadi beberapa efek seperti (1) penurunan jumlah sel T akibat dihambatnya IL-2, terhambatnya diferensiasi Th1, dan induksi apoptosis, (2) terjadi apoptosis eosinofil akibat dihambatnya IL-5, (3) disfungsi makrofag akibat

dihambatnya IL-1 dan TNF- $\alpha$ , (4) terganggunya migrasi neutrofil ke lokasi inflamasi, peningkatan sekresi neutrofil ada sumsum tulang, penurunan apoptosis yang mengakibatkan leukositosis, dan (5) sedikit penurunan produksi Ig oleh sel B (Wiseman, 2016).

## 2.8 Tikus (*Rattus norvegicus*)

Tikus merupakan salah satu hewan percobaan yang banyak dipilih untuk digunakan pada penelitian selain hewan mencit. Hewan percobaan merupakan hewan yang sengaja dipelihara dan diternakkan untuk menjadai hewan model guna penelitian yang mempelajari dan mengembangkan bidang ilmu dalam skala penelitian laboratoris (Malole dan Pramono, 1989). Tiga galur tikus yang banyak digunakan sebagai hewan coba pada penelitian antara lain Wistar, *Long evans*, dan *Sprague dawley* (Vinerean, 2017). Tikus putih memiliki taksonomi sebagai berikut (Ruedas, 2016):

Kingdom : Animalia  
Phylum : Chordata  
Class : Mammalia  
Ordo : Rodentia  
Famili : Muridae  
Genus : *Rattus*  
Spesies : *norvegicus*

Tikus dipilih menjadi hewan coba karena memiliki beberapa keuntungan seperti dapat mencerminkan karakter fungsional dari sistem tubuh pada mamalia, pertumbuhan yang cepat, siklus reproduksi yang singkat, tempramen baik, cukup

tahan dengan perlakuan, ukuran lebih besar dari hewan mencit (*Mus musculus*) serta mudah dipelihara dalam jumlah besar (Akbar, 2010). Tikus galur Wistar banyak digunakan dalam penelitian bidang penyakit infeksi, metabolisme, nutrisi, onkologi, farmakologi, fisiologi, teratologi, toksikologi dan penelitian pada usia tua (Janvier Labs, 2017).



**Gambar 2.4** Tikus (*Rattus norvegicus*) galur Wistar (Janvier Labs, 2017).

### **2.8.1 Tikus (*Rattus norvegicus*) sebagai hewan model gastroenteritis bakterial**

Hewan coba tikus telah digunakan sebagai hewan model gastroenteritis bakterial pada penelitian sebelumnya, pada penelitian Maenza *et al.* (1970), tikus jantan galur Walter Reed dengan BB 250-300 gram diinfeksi bakteri *Salmonella typhimurium* secara peroral intragastric. Perubahan morfologi dari organ jejunum, ileum dan caecum selanjutnya diamati. Havelaar *et al.* (2001), melakukan penelitian menggunakan tikus jantan galur Wistar dengan menginfeksi menggunakan bakteri *Salmonella enterica* dengan dosis yang berbeda pasca dilakukan pemuasaan selama satu malam dan diberi sodium bicarbonate untuk menetralkan dari asam lambung. Ditemukan bahwa gejala sakit ditemukan pada tikus yang diinfeksi dosis  $10^8$  CFU atau lebih. Dosis rendah yang diberikan pada

tikus tidak memberikan gejala sakit pada tikus namun perubahan histopatologi pada saluran pencernaan dapat teramati.

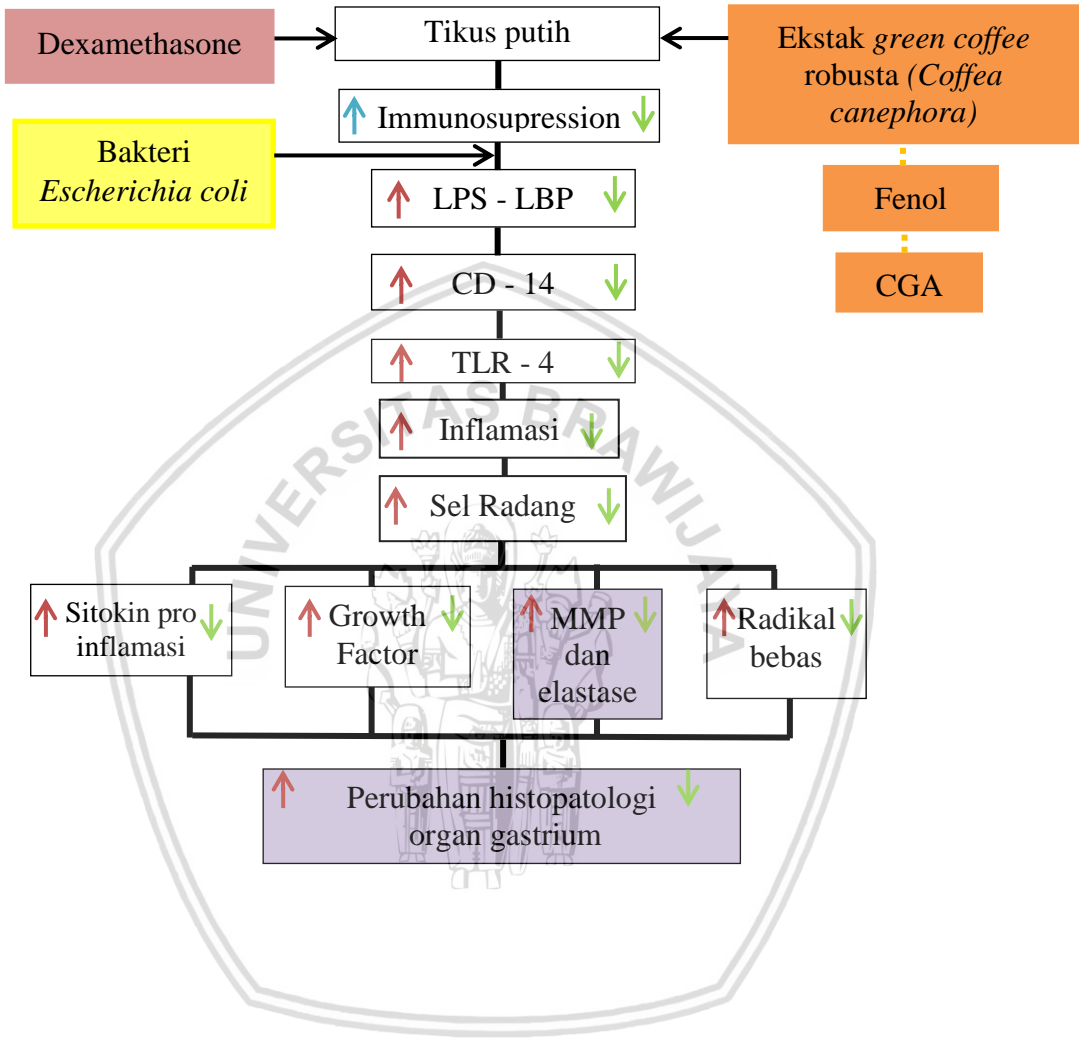
Pembuatan hewan model gastroenteritis bakterial menggunakan bakteri lainnya seperti bakteri *Escherichia coli* sudah pernah dilakukan. Mushtaq *et al.* (2005), menginfeksi bakteri *Escherichia coli* pada tikus usia dua hari yang mengakibatkan kolonisasi bakteri *Escherichia coli* pada gastrointestinal dan mengakibatkan keadaan bakterimia. Bakterimia dapat mengakibatkan infeksi sistemik pada tubuh tikus.





### BAB 3 KERANGKA KONSEPTUAL

#### 3.1 Kerangka Konsep



Keterangan :

→	: Pemberian	↓	: Penurunan akibat ekstrak
	: Patomekanisme	■	: Variabel terikat
■	: Terapi	■	: Variabel bebas
↑	: Peningkatan akibat <i>E.coli</i>	↑	: Peningkatan akibat dexamethasone

Ekstrak *green coffee* robusta diberikan pada tikus putih (*Rattus norvegicus*) galur Wistar dengan dosis 500, 1000 dan 1500mg/kgBB sebanyak 2 ml. Pemberian ekstrak dilakukan sekali dalam sehari selama 14 hari pada hari ke-8 hingga ke-21. Ekstrak *green coffee* robusta memiliki kandungan CGA (*chlorogenic acid*) yang tinggi dan dapat berperan sebagai antioksidan, antiinflamasi dan antimikroba. Pada induksi LPS, CGA berperan dalam menekan ekspresi COX-2 pada tingkat protein dan mRNA dengan mengatenuasi aktivasi dari NF-kB dan JNK/AP-1 *signaling pathway*, yang berakibat pada terhambatnya produksi prostaglandin E<sub>2</sub> (PGE<sub>2</sub>) (Shan, 2009). CGA juga menghambat produksi NO dan ekspresi iNOS tanpa mengakibatkan sitotoksitas serta menurunkan sitokin pro-inflamasi seperti IL-1 $\beta$  dan TNF- $\alpha$ .

Pada hari ke-21 hingga ke-24, dexamethasone diinjeksikan ke dalam tubuh hewan coba dengan dosis 5mg/kgBB selama tiga hari secara IP (intraperitoneal). Pemberian dexamethasone dosis tinggi dapat memunculkan keadaan *immunosuppression* yang diakibatkan oleh lipocortin yang mampu menghambat kerja PLA<sub>2</sub> (Phospholipase A<sub>2</sub>). PLA<sub>2</sub> yang terganggu mengakibatkan gangguan produksi asam arachidonat yang merupakan bahan untuk menghasilkan eicosanoid seperti prostaglandin, tromboxane dan leukotrien.

Bakteri *Escherichia coli* dengan konsentrasi  $3 \times 10^8$  CFU/ml diberikan sebanyak 1 ml pada hari ke-25 hingga ke-31 dengan cara sonde lambung. Bakteri *Escherichia coli* sub tipe *Enteropathogenic Escherichia coli* (EPEC) memiliki ekstraselular protease yang berperan dalam proses kolonisasi bakteri dengan cara menghancurkan lapisan mukus pada gastrointestinal. Selanjutnya, kandungan

lipopolisakarida (LPS) yang bersifat endotoksin pada membran selnya dapat memicu adanya sistem imun dalam tubuh hospes. Bakteri yang masuk dalam gastrium akan menghancurkan mikrovili dan melakukan adhesi antara intimin dan *translocated intimin receptor* (Tir). Tir dihasilkan oleh bakteri dan ditransfer ke sel hospes melalui *type III secretion system* (T3SS). Setelah terjadi adhesi, LPS akan berikatan dengan *LPS-binding protein* (LBP), LBP selanjutnya memfasilitasi LPS untuk berikatan dengan CD-14 dan LBP akan terlepas setelah LPS telah berikatan dengan CD-14. LPS dan CD-14 akan dibantu oleh protein asesoris berupa MD2 untuk berikatan dengan *toll like receptor* (TLR) 4. TLR merupakan protein yang dapat mengaktifkan proses fagositosis terhadap mikroorganisme. TLR4 merupakan TLR spesifik yang berikatan dengan endotoksin berupa LPS. Ikatan antara LPS, CD-14 dan MD2 terhadap TLR4, dapat mengaktifkan *nuclear factor kappa-B* (NF- $\kappa$ B), makrofag dan neutrofil.

NF- $\kappa$ B yang teraktivasi mengakibatkan dihasilkannya sitokin pro-inflamasi. Makrofag yang berada di jaringan dan telah teraktivasi setelah mengenal keberadaan mikroba, mensekresikan sitokin TNF, IL-1 dan chemokin. TNF dan IL-1 akan bekerja pada sel endotel dengan menginduksi ekspresi dari beberapa molekul adhesi. Sel endotel dalam waktu 1-2 jam, mulai mengekspresikan E-selectin, VCAM-1, dan ICAM-1. Chemokin yang telah diproduksi selanjutnya memasuki pembuluh darah dan berperan dalam perlekatan leukosit dan menstimulasi leukosit untuk migrasi melalui *interendothelial spaces* yang berakibat pada akumulasi neutrofil dan makrofag pada daerah yang terinfeksi mikroba. Neutrofil dan makrofag selanjutnya mengenal mikroba akibat

ikatan TLR4 pada permukaan sel imun dengan LPS. Neutrofil dan makrofag selanjutnya teraktivasi akibat paparan LPS dan mengakibatkan sel imun melakukan proses fagositosis. Bakteri *Escherichia coli* yang mengandung LPS difagositosis oleh sel imun dan berada dalam fagosom. Fagosom selanjutnya melakukan fusi dengan lisosom yang membentuk fagolisosom. Fagolisosom dari neutrofil dan makrofag, membunuh bakteri *Escherichia coli* dengan memproduksi molekul mikrobisidal. Molekul tersebut yaitu ROI (*Reactive Oxygen Intermediet*), enzim elastase dan RNI (*Reactive Nitrit Intermediet*). ROI seperti superoxide/hydrogen peroxide akan bereaksi dengan RNI seperti nitric oxide yang menghasilkan radikal peroxylnitrit yang sangat reaktif dan dapat membunuh bakteri *Escherichia coli*. Enzim elastase yang dihasilkan oleh neutrofil dan makrofag merupakan salah satu contoh dari enzim protease.

Sel radang yang teraktivasi secara berlebih dapat merusak jaringan normal hospes karena produk mikrobisidal dapat keluar menuju ekstraseluler dan mengakibatkan kerusakan jaringan. Hal ini dikarenakan produk mikrobisidal ini tidak mampu membedakan antara jaringan milik hospes dan milik mikroba. Sehingga produk seperti ROS, NO, dan enzim lisosomal mampu mengakibatkan kerusakan jaringan milik hospes. ROS dan NO berfungsi membunuh mikroba, MMP yang dihasilkan berperan dalam remodeling jaringan bersama *growth factor* seperti *fibroblast growth factor* (FGF), *angiogenic factor* (VEGF) dan TGF- $\beta$ . FGF berperan dalam proses kemotaktik dan mitogenik dari fibroblast. VEGF berperan dalam proses mitogenik sel endotel dan angiogenesis. TGF- $\beta$  berperan dalam proses remodeling dengan menyebabkan sistesis dari ekstraselular matriks

protein seperti kolagen dan MMP yang dapat memicu perbaikan jaringan pasca reaksi inflamasi dapat terkontrol. MMP yang merupakan protease, jika dalam jumlah berlebih akibat proses fagositosis maka dapat mengakibatkan kerusakan jaringan. (Abbas and Litchman, 2005; Kumar *et al.*, 2010).

Selain protease yang berasal dari ekstraseluler bakteri dan akibat proses inflamasi, protease lainnya juga didapat dari bakteri *E.coli* seperti NleC, NleD, EspC dan OmpT. NleC dan NleD merupakan golongan metalloprotease yang menurunkan respon imun tubuh dengan cara mentarget NF- $\kappa$ B, JNK serta p38. EspC berperan dalam mengakibatkan apoptosis dan nekrosis akibat infeksi EPEC. OmpT (*outer membrane protease*) berperan dalam degradasi  $\alpha$ -helical AMPs (*antimicrobial peptide*). Enzim protease yang dihasilkan dalam jumlah terlalu tinggi dapat mengakibatkan kerusakan pada sel hospes sehingga dapat merubah gambaran histopatologi gastrium.

### 3.2 Hipotesis Penelitian

Pemberian ekstrak kopi hijau sebagai terapi preventif mampu menekan peningkatan aktivitas protease dan memperbaiki gambaran histopatologi lambung hewan coba tikus putih yang telah diinduksi bakteri *Escherichia coli*.

## BAB 4 METODE PENELITIAN

### 4.1 Waktu dan Tempat Penelitian

Penelitian ini dilakukan selama satu bulan, mulai tanggal 30 Agustus 2017 hingga 29 September 2017. Penelitian dilakukan pada beberapa tempat yaitu pada laboratorium Mikrobiologi dan Imunologi Fakultas Kedokteran Hewan Universitas Brawijaya sebagai tempat pembiakan bakteri *Escherichia coli*, dan nekropsi. PT Materia Medica, kota Batu sebagai tempat pembuatan ekstrak *coffee robusta*, laboratorium Kimia Fakultas MIPA Universitas Brawijaya sebagai tempat analisa aktivitas protease dan Laboratorium Kessima Medika sebagai tempat pembuatan preparat histopatologi organ gastrium.

### 4.2 Alat dan Bahan Penelitian

#### 4.2.1 Alat

Peralatan yang digunakan selama penelitian berlangsung yaitu kandang tikus dari plastik berukuran 28cm x 38cm x 14 cm yang ditutupi jaring kawat, tempat pakan tikus, botol minum tikus, spuit 1cc, spuit 3cc, tabung erlenmeyer 100 ml, tabung reaksi, sonde lambung untuk tikus, mikropipet 10-100  $\mu$ m, *yellow tip*, *blue tip*, vortex, timbangan digital, kapas, aluminium foil, *gloves*, masker, *dissecting set*, papan bedah, cawan petri, tabung erlenmeyer 100 ml, wadah organ, mikrotom, *object glass*, *cover glass*, lemari pendingin, spektrofotometer, mikroskop cahaya dan kamera.

#### 4.2.2 Bahan

Bahan yang dipergunakan selama penelitian berlangsung yaitu tikus putih (*Rattus norvegicus*) galur Wistar dengan usia 8-10 minggu, jenis



kelamin jantan dengan berat 150-200 gram (Gani dkk, 2013). Tikus didapat dari d'Wistar Bandung. Minuman untuk tikus berupa air mineral kemasan secara *ad libitum*. Pakan tikus standar berupa BR-1. Pakan tikus diberikan sebanyak 10% dari berat badan (Upa dkk, 2017). Bahan lain yang diperlukan yaitu sekam, aquabides, PBS, ekstrak *green coffee* robusta, alkohol, formalin 10%, akuades, sampel organ gastrium, etanol, xylol, Hematoxyline-Eosin, kasein, TCA (Trichloroasetat), PBS (*Phospate Buffered Saline*) tween, PMSF (phenylmethane sulfonyl fluoride), Tris-HCl (hydrochloride), buffer fosfat.

#### 4.3 Rancangan Penelitian

Penelitian bersifat eksperimental menggunakan Rancangan Acak Lengkap (RAL). Berdasarkan Mattjik dan Sumertajaya (2006), rancangan acak lengkap merupakan jenis rancangan percobaan dimana perlakuan diberikan secara acak pada seluruh unit percobaan. Media atau lingkungan percobaan yang homogen atau seragam mengakibatkan media atau tempat percobaan tidak memberi pengaruh berarti pada respon yang diamati. Pada model rancangan ini, keragaman atau variasi hasil hanya diakibatkan oleh perlakuan yang diuji cobakan pada unit percobaan, sehingga faktor di luar perlakuan seperti faktor lingkungan sedapat mungkin dikondisikan serba homogen. Keuntungan dari penggunaan rancangan acak lengkap yaitu denah perancangan percobaan yang mudah dibuat, analisa statistik terhadap unit percobaan sederhana, dan fleksibel dalam jumlah perlakuan serta pengulangan (Pratisto, 2004).

Pada penelitian ini, terdapat lima perlakuan yang dilakukan, sehingga jumlah sampel yang diperlukan dapat dihitung menggunakan:



$$t(n-1) \geq 15$$

$$5(n-1) \geq 15$$

$$5n - 5 \geq 15$$

$$5n \geq 20$$

$$n \geq 4$$

Keterangan :  
t = jumlah perlakuan  
n = jumlah ulang

(Soehono, 2016)

Berdasarkan perhitungan diatas didapat bahwa untuk melakukan penelitian menggunakan lima perlakuan, maka diperlukan sebanyak empat kali ulangan, yang artinya tiap perlakuan memerlukan empat ekor tikus sehingga total tikus yang diperlukan berjumlah 20 ekor tikus. Pembagian kelompok penelitian ditunjukkan pada **Tabel 4.1** sebagai berikut :

**Tabel 4.1** Rancangan Kelompok Penelitian

Kelompok	Keterangan
(Kontrol negatif)	Tikus putih ( <i>Rattus norvegicus</i> ) yang hanya diberikan perlakuan aklimatisasi
(Kontrol positif)	Tikus putih ( <i>Rattus norvegicus</i> ) diberikan perlakuan aklimatisasi, injeksi Dexamethasone, dan diinfeksi <i>Escherichia coli</i>
P1 (Perlakuan 1)	Tikus putih ( <i>Rattus norvegicus</i> ) diberikan perlakuan aklimatisasi, injeksi Dexamethasone, diinfeksi <i>Escherichia coli</i> , dan sonde ekstrak <i>green coffee</i> Robusta dosis 500 mg/kgBB
P2 (Perlakuan 2)	Tikus putih ( <i>Rattus norvegicus</i> ) diberikan perlakuan aklimatisasi, injeksi Dexamethasone, diinfeksi <i>Escherichia coli</i> , dan sonde ekstrak <i>green coffee</i> Robusta dosis 1000 mg/kgBB
P3 (Perlakuan 3)	Tikus putih ( <i>Rattus norvegicus</i> ) diberikan perlakuan aklimatisasi, injeksi Dexamethasone, diinfeksi <i>Escherichia coli</i> , dan sonde ekstrak <i>green coffee</i> Robusta dosis 1500 mg/kgBB

#### 4.4 Variabel Penelitian

Variabel pada penelitian ini meliputi:

- Variabel terikat : aktivitas protease dan histopatologi gastrium
- Variabel bebas : bakteri *Escherichia coli*, ekstrak *green coffee* robusta
- Variabel kontrol : kandang, suhu, pakan, minum, berat badan, usia, jenis kelamin hewan coba, konsentrasi larutan bakteri *Escherichia coli*  $3 \times 10^8$  CFU/ ml, konsentrasi ekstrak *green coffee* robusta (500, 1000 dan 1500 mg/kgBB), dosis dexamethasone 5 mg/kgBB

## 4.5 Prosedur Kerja

### 4.5.1 Pembuatan Ekstrak *Green Coffee* Robusta

Kopi hijau yang digunakan yaitu bagian biji kopi robusta yang telah dikupas dan belum mengalami proses penyangraian. Buah kopi dianggap masak antara minggu ke-28 hingga minggu ke-34 pasca mekarnya bunga kopi (Rahardjo, 2017).

Ekstraksi pada *green coffee* robusta dilakukan dengan menimbang serbuk biji kopi yang dipakai. Pada penelitian ini digunakan kopi robusta lampung sebanyak 414 gram yang selanjutnya dibasahi menggunakan pelarut etanol 90% sebanyak 500 ml. Etanol digunakan sebagai pelarut organik karena sifatnya yang relatif selektif terhadap kafein sehingga proses dekafeinasi kopi dapat terjadi. Dekafeinasi kopi merupakan proses penurunan kadar kafein pada biji kopi hijau (Kartasasmita, 2012). Serbuk yang telah dibasahi selanjutnya dipindahkan ke dalam toples untuk diratakan dan diberi pelarut etanol 90% hingga terendam yaitu sebanyak 1,5 liter (pelarut yang digunakan minimal dua kali berat atau lebih). Toples selanjutnya ditutup rapat

selama 24 jam dan dishaker diatas shaker digital dengan kecepatan 50 rpm. Ekstrak cair selanjutnya disaring dengan kain dan hasilnya ditampung di erlenmeyer. Ampas serbuk biji kopi dimasukkan kembali dalam toples, serta ditambah pelarut sebanyak 1,5 liter dan ditunggu selama 24 jam diatas *shaker* kecepatan 50 rpm. Hasil ekstrak cair pertama dan kedua dijadikan satu, lalu diuapkan dengan *rotary evaporator* selama empat jam. Ekstrak hasil dari *rotary evaporator*, selanjutnya dievaporasi kembali diatas *water bath* selama dua jam. Proses evaporasi menghasilkan ekstrak berupa cairan.

#### 4.5.2 Pemberian Preventif Ekstrak *Green Coffee Robusta*

Pemberian terapi preventif ekstrak *green coffee (Coffea canephora)* menggunakan literatur berdasarkan Haque (2013), dimana dosis *green coffee* yang digunakan yaitu 50-250 mg/kg BB pada mencit. Penghitungan dosis pada tikus menggunakan tabel konversi berdasarkan Laurence and Bacharach (1964), sehingga didapat dosis 500 mg/kgBB, 1000 mg/kgBB, dan 1500mg/kgBB. Ekstrak diencerkan menggunakan aquabides yang selanjutnya diberikan sebanyak 2 ml. pemberian ekstrak dilakukan selama 14 hari (Setyono dkk, 2014).

#### 4.5.3 Pembuatan Suspensi *Escherichia coli*

Suspensi bakteri *Escherichia coli* yang dibuat disesuaikan kekeruhannya dengan larutan standar McFarland no.1 yang memiliki kisaran jumlah bakteri sebanyak  $3 \times 10^8$  CFU/ml (Astawan dkk, 2011), Suspensi bakteri yang telah disesuaikan kekeruhannya, selanjutnya diambil sebanyak 1 ml

untuk diberikan pada hewan coba selama 7 hari menggunakan sonde lambung (Borella *et al.*, 1999)

#### 4.5.4 Pembuatan Hewan Model Gastroenteritis Bakterial

Pembuatan hewan coba model gastroenteritis bakterial diawali dengan proses aklimatisasi pada tikus putih (*Rattus norvegicus*) galur Wistar dengan jenis kelamin jantan, usia 8-10 minggu, berat kisaran 150-200 gram (Gani dkk, 2013). Aklimatisasi dilakukan selama tujuh hari mulai hari pertama tikus datang hingga hari ke-7. Aklimatisasi bertujuan agar tikus mampu beradaptasi terhadap lingkungan yang baru, sehingga meminimalkan stress dan tikus mampu mengekspresikan tingkah laku alamiahnya (*Institute of Laboratory Animal Resources Commision of Life Sciences*, 2010).

Hewan coba ditempatkan dalam kandang plastik berukuran 28cm x 38cm x 14 cm yang ditutupi jaring kawat, pada tiap kandang diisi sebanyak empat ekor tikus. Tikus diberi minum air mineral secara *ad libitum* dan pakan sebanyak 10% dari berat badan (Upa dkk, 2017). Pakan tikus yang diberikan menggunakan pakan standar BR-1®. Tikus pada hari ke-8, ditimbang berat badannya dan diacak pada lima kelompok perlakuan (Nurkhasanah dkk, 2016).

Pada hari ke-8 hingga hari ke-21, ekstrak *green coffee* robusta diberikan pada tikus kelompok P1, P2, dan P3 dengan dosis bertahap yaitu 500mg/kgBB, 1000mg/kgBB dan 1500mg/kgBB selama 14 hari (Setyono

dkk, 2014). Pada hari ke-22 hingga hari ke-24, dexamethasone diberikan dengan dosis 5 ml/kgBB *b.i.d* selama 3 hari secara IP (Sulaiman *et al.*, 2010). Selanjutnya, pada hari ke-25 hingga hari ke-31, hewan coba tikus diberi suspensi *Escherichia coli* selama 7 hari melalui sonde lambung (Astawan dkk, 2011).

#### 4.5.5 Pengambilan Organ Gastrium Hewan Coba

Pengambilan organ gastrium dilakukan pada hari ke-32. Sebelum pengambilan organ, proses pertama yang dilakukan adalah euthanasi hewan coba dengan cara dislokasi leher, kemudian hewan coba diletakkan pada papan pembedahan. Pembedahan dilakukan pada bagian abdomen menggunakan peralatan dari *dissecting set*. Pembedahan dilakukan mengikuti linea alba, hingga organ visceral pada abdomen dapat terlihat. Gastrium pada tikus berada dibalik hepar. Organ gastrium selanjutnya dipotong, diambil dan dibilas dengan NaCl fisiologis 0.9% (Vdoviaková *et al.*, 2016). Organ gastrium yang diambil berada di bagian antrara non-glandular dan bagian glandular. Potongan organ gastrium yang akan dianalisa, direndam pada *Buffered Neutral Formalin* (BNF) 10% dengan pH kisaran 6,5-7,5 untuk mengawetkan organ. Gastrium yang telah diawetkan, dimasukkan ke dalam wadah organ untuk dianalisa.

#### 4.6 Pengukuran Enzim Protease

Organ gastrium ditimbang sebanyak 0,5 gr, dipotong menjadi beberapa bagian dan ditambahkan larutan PBS-tween : PMSF (9:1) sebanyak 1 ml, ditambahkan pasir kuarsa dan digerus dengan mortar dingin yang diletakkan

diatas balok es. Homogenat yang dihasilkan selanjutnya diberi larutan PBS-tween : PMSF (9:1) sebanyak 2 ml dan dipindahkan ke tabung polipropilen. Tabung polipropilen berisi homogenat dihomogenkan dengan vorteks selama 10 menit, disonikasi dengan sonikator selama 10 menit dan disentrifugasi selama 15 menit dengan kecepatan 6000 rpm. Supernatan selanjutnya diambil dan ditambahkan etanol absolut dingin dengan perbandingan 1:1 yang dibiarkan semalaman. Supernatan di sentrifugasi kembali selama 10.000 rpm dan endapan diambil untuk dikeringkan hingga bau etanol menghilang. Endapan selanjutnya ditambah dengan larutan 0,02 M Tris-HCl pH 6,5 dengan perbandingan 1:1 dan dilakukan homogenisasi. Sebelum mengukur aktivitas protease, dipersiapkan campuran kasein 500 ppm sebanyak 200 µl, larutan buffer fosfat pH 7 300 µl dan 100 µl enzim protease yang didiamkan selama 60 menit pada suhu 37°C diatas *waterbath*. Larutan TCA 4% sebanyak 400 µl ditambahkan pada campuran tersebut serta didiamkan selama 30 menit pada suhu 27°C, lalu disentrifugasi 4000 rpm selama 10 menit. Supernatan diambil 100 µl dan diencerkan sebanyak lima kali volume sampel dengan buffer fosfat lalu diukur nilai absorpsi pada  $\lambda_{maks}$  tirosin sebesar 275 nm. Larutan blanko selanjutnya dibuat dengan cara yang sama menggunakan aquades (Wati, 2013).

Pengukuran aktivitas enzim protease dilakukan berdasarkan metode Walter (1984) menggunakan rumus:

Aktivitas enzim =

$$\frac{[Tirosin]}{Mr\ Tirosin} \times \frac{v}{pxq} \times fp$$

Keterangan :



Mr = Massa relatif  
V = volume total (mL)  
q = waktu inkubasi (menit)  
fp = faktor pengenceran  
p = jumlah enzim (mL)

#### 4.7. Pembuatan Preparat Histopatologi Gastrium

Pembuatan preparat histopatologi diawali dengan mengumpulkan sampel berupa jaringan yang diambil secepat mungkin setelah hewan mati. Jaringan yang didapat direndam di dalam zat kimia yang berfungsi sebagai pengawet agar menghindari pencernaan jaringan oleh enzim otolisis atau bakteri serta bertujuan melindungi struktur fisik sel. Bahan pengawet yang dapat digunakan yaitu *Buffered Neutral Formalin* (BNF) 10% dengan pH kisaran 6,5-7,5. Lama fiksasi jaringan minimal dua hari dengan perbandingan antara organ dan larutan yaitu 1 : 10. Selanjutnya, jaringan organ ditiriskan dan dipotong dengan ketebalan 0,3-0,5 mm dan disusun ke dalam *tissue cassette*. Beberapa *tissue cassette* dimasukkan ke dalam keranjang khusus (*basket*) dan dilakukan proses selanjutnya (Muntiha, 2001).

Jaringan selanjutnya melalui proses *embedding* yang tujuannya memudahkan proses pemotongan preparat. Setelah fiksasi, jaringan diinfiltrasi dengan substansi *embedding* seperti parafin atau resin. Proses *embedding* terdiri atas dua tahap yaitu dehidrasi dan *clearing*. Air yang terkandung di jaringan dikeluarkan dengan cara merendam jaringan pada cairan etanol bertingkat (umumnya dari 70% hingga 100%). Etanol selanjutnya digantikan dengan pelarut yang mudah larut dengan medium *embedding*. Pada *embedding* parafin, pelarut yang digunakan umumnya adalah xylene. Setelah jaringan menjadi transparan

akibat pelarut, jaringan dimasukkan pada parafin cair pada suhu 58°C - 60°C di oven. Panas mengakibatkan pelarut menguapkan dan ruang di dalam jaringan terisi oleh parafin. Setelah dikeluarkan dari oven, jaringan akan mengeras bersama parafin (Junqueira and Carneiro, 2006).

Proses selanjutnya yaitu *sectioning* dengan memotong blok parafin hingga nampak jaringan yang akan diamati dan dipotong menggunakan mikrotom. Hasil pemotongan dapat diapungkan diatas air hangat agar didapat hasil preparat jaringan yang tidak tertekuk. Umumnya preparat jaringan dipotong selebar 5 – 7 µm dan dikoleksi pada gelas objek. Sebelum diwarnai, parafin harus dihilangkan dengan rehidrasi. Pewarnaan yang digunakan yaitu Hematoxylene-Eosin (HE) yang tersusun atas dua pewarna yaitu hematoxylene yang merupakan pewarna basa akan memberi warna biru atau ungu pada komponen sel yang bersifat asam seperti kromatin dan sel sekretori, sedangkan eosin yang merupakan pewarna asam akan memberi warna merah hingga merah muda untuk komponen sel seperti sitoplasma dan komponen ekstraseluler. Setelah pewarnaan, preparat jaringan di dehidrasi, *clearing* dan diberi dilapisi dengan *mounting* medium. *Coverslip* selanjutnya dapat diletakkan diatas preparat jaringan (Banks, 1993).

Pengamatan preparat dibawah mikroskop cahaya dapat dilakukan dengan meletakkan preparat pada meja benda dan diamati dengan perbesaran objektif 4x. Gunakan *revolving nosepiece* untuk mengganti ke perbesaran objektif 10x sampai 40x jika diperlukan. Pada perbesaran objektif 40x pengaturan terhadap kondensor perlu dilakukan. Pengamatan terhadap preparat gastrium dapat dilakukan dengan mengidentifikasi bagian – bagian dari gastrium seperti tunika mukosa, tunika

submukosa, tunika muskularis dan tunika serosa. Pada bagian mukosa dapat diamati gastric pit, sel epitel, sel sekretori gastrium, jaringan ikat dan muskularis mukosa. Pembuluh darah, serabut saraf dari plexus Meissner dapat ditemukan pada tunika mukosa. Otot polos nampak tersusun dari beberapa arah serta terdapat plexus Auerbach pada tunika muskularis. Tunika serosa akan nampak meliputi permukaan luar dari gastrium (Spitalnik, 2016).

Pada kasus gastroenteritis fase awal, pada histopatologi gastrium dapat ditemukan kerusakan jaringan pada bagian tunika mukosa berupa penurunan jumlah mucin dalam sitoplasma, peningkatan ukuran sel nukleus, ditemukan nukleoli lebih dari satu di dalam sel, peningkatan jumlah sel yang bermitosis pada bagian dasar dari *gastric pits*, serta infiltrasi sel radang pada bagian epitel dan lamina propria (Sternberg, 1991).

#### 4.8 Analisa Data

Data yang diperoleh dari pemeriksaan histopatologi gastrium merupakan data kualitatif sedangkan data dari aktivitas protease merupakan data kuantitatif. Data dari pemeriksaan histopatologi gastrium dianalisa menggunakan analisa deskriptif. Data dari pemeriksaan aktivitas protease dapat dianalisa secara statistik dengan metode *One Way ANOVA (Analysis of Variance)* dengan tingkat kepercayaan sebesar 95% ( $p < 0,05$ ), jika terdapat perbedaan yang nyata maka dilanjutkan dengan uji Tukey.





## BAB 5 HASIL DAN PEMBAHASAN

### 5.1 Hasil Pra-Penelitian

Sebelum melaksanakan penelitian, dilakukan proses pra-penelitian dengan tujuan memastikan bahwa tikus yang diinduksi bakteri *Escherichia coli* strain EPEC (*Enteropathogenic E. coli*) mampu menyebabkan gastroenteritis pada saluran cerna. Tikus yang digunakan pada pra-penelitian diinduksi bakteri *E. coli* dengan dosis  $3 \times 10^8$  CFU selama tujuh hari. Selama proses pra-penelitian, dilakukan pengamatan terhadap keadaan feses dari tikus. Pasca tujuh hari induksi *E. coli*, ditemukan bahwa tikus masih belum mengalami diare (Kondisi feses tikus pra-penelitian terlampir pada **Lampiran 13**), yang berdasarkan pendapat dari Soenarto (2011), merupakan salah satu gejala dari gastroenteritis.

Berdasarkan hasil pra-penelitian tersebut, maka diputuskan untuk memberikan kortikosteroid seperti dexamethasone dengan dosis imunosupresan sebanyak 5 mg/kgBB (Sulaiman *et al.*, 2010). Pemberian dexamethasone sebagai imunosupresan dapat menghambat faktor transkripsi seperti NF-kB dan *activator protein-1* (AP-1). Saat faktor transkripsi terhambat, maka terjadi beberapa efek seperti (1) penurunan jumlah sel T akibat dihambatnya sitokin IL-2, terhambatnya diferensiasi Th1, dan induksi apoptosis, (2) terjadi apoptosis eosinofil akibat dihambatnya IL-5, (3) disfungsi makrofag akibat dihambatnya sitokin IL-1 dan TNF- $\alpha$ , (4) terganggunya migrasi neutrofil menuju lokasi inflamasi, dan (5) penurunan produksi Ig oleh sel B (Wiseman, 2016).



## 5.2 Hasil Deteksi CGA (*Chlorogenic acid*)

Kandungan *Chlorogenic Acid* (CGA) pada *green coffee* robusta dapat diidentifikasi menggunakan LC-MS (*Liquid Chromatography Mass Spectroscopy*). Berdasarkan hasil analisa dengan LC-MS yang terlampir pada **Lampiran 4**, terdeteksi adanya senyawa CGA pada kopi robusta seperti 3-O-caffeoylquinic acid, 5-O-feruloylquinic acid, 4-O-caffeoyl-5-O-feruloylquinic acid, dan 3-O-feruloyl-4-O-caffeoylquinic acid (Mullen *et al.*, 2011).

LC-MS digunakan dalam mendeteksi CGA karena merupakan perangkat gabungan dari HPLC (*High Performance Liquid Chromatography*) dan *Mass Spectroscopy* yang mampu mengidentifikasi senyawa berdasarkan berat molekul analitnya. HPLC merupakan kromatografi, yang berperan dalam memisahkan satu analit dengan lainnya dengan cara melewati komponen senyawa yang akan dipisah melalui dua fase berbeda yaitu fase diam dan fase bergerak. *Mass spectroscopy* bekerja dengan cara ionisasi analit sehingga didapat berat molekul yang berguna dalam proses identifikasi senyawa (Cappiello, 2007).

## 5.3 Hasil Induksi *Escherichia coli*

Pasca tujuh hari induksi bakteri *Escherichia coli*, diketahui bahwa tikus menunjukkan beberapa gejala klinis yang merujuk pada keadaan gastroenteritis seperti diare dan penurunan berat badan. Tikus mengalami diare yang dapat diamati dari perubahan konsistensi feses (gambar terlampir pada **Lampiran 13**). Tikus kontrol positif yang telah diinfeksi bakteri *E. coli*  $3 \times 10^8$  CFU sebanyak 1 ml selama tujuh hari, menunjukkan perubahan konsistensi pada feses. Menggunakan *Bristol stool scale* (Giligan *et al.*, 2014), feses kontrol positif tergolong dalam tipe

feses nomor lima sebab feses nampak berwarna coklat muda dengan konsistensi lunak dan berair. Sebelum induksi bakteri *E.coli*, tikus memiliki feses yang termasuk dalam tipe nomor tiga, dimana feses memiliki konsistensi padat, berbentuk lonjong, dan terlihat tekstur pecahan pada permukaan.

Berat badan tikus pasca induksi *E. coli* pada kelompok kontrol positif dan perlakuan mengalami penurunan dibandingkan sebelum pemberian dexamethasone, sedangkan pada tikus kontrol negatif terjadi peningkatan berat badan. Perubahan berat badan terlampir pada **Lampiran 14**. Penurunan berat badan pada hewan coba gastroenteritis dapat diakibatkan oleh infeksi dari bakteri *E.coli* (Soenarto, 2011).

#### **5.4 Pengaruh Preventif Ekstrak *Green Coffee Robusta* (*Coffea canephora*) terhadap Gambaran Histopatologi Gastrium Hewan Tikus yang Diinduksi Gastroenteritis Bakterial**

Pengamatan histopatologi organ gastrium milik tikus penderita gastroenteritis bakterial perlu dilakukan untuk mengetahui pengaruh preventif dari ekstrak *green coffee* robusta dalam mencegah kerusakan gastrium. Gambaran histopatologi organ gastrium ditunjukkan pada **Gambar 5.4.1** hingga **Gambar 5.4.10**. Organ gastrium pada tikus memiliki struktur yang cukup berbeda dari mamalia lainnya, karena terbagi atas dua bagian yaitu gastrium non-glandular dan glandular (Matsukura *et al.*, 1997).

##### **A. Kelompok Kontrol Negatif**

Hasil histopatologi dari tikus kelompok kontrol negatif menunjukkan bahwa organ gastrium bagian non-glandular (**Gambar 5.4.1**) dan glandular

(**Gambar 5.4.2**) terlihat dalam keadaan yang normal, karena struktur penyusun organ gastrium nampak terlihat utuh dan dapat diidentifikasi dengan baik. Lamina epitelial pada bagian non-glandular nampak dilapisi oleh epitel skuamus kompleks yang terlihat seperti tumpukan sel epitel dengan kornifikasi berwarna merah. Bentuk epitel skuamus pada bagian dasar lapisan epitel, nampak pipih dimana terlihat inti sel berbentuk pipih ditengah. Hasil pewarnaan Hematoxyline-Eosin menampilkan bahwa epitel skuamus kompleks berwarna merah keunguan. Kornifikasi tidak mempunyai inti sel dan nampak melapisi bagian sel epitel yang berbatasan dengan daerah lumen (**Gambar 5.4.1**), sedangkan pada bagian glandular dari gastrium tersusun oleh epitel kolumner simplek tanpa lapisan kornifikasi (**Gambar 5.4.2**). Gambaran ini sesuai dengan pernyataan dari Matsukura *et al.* (1997), mengenai deskripsi histologi gastrium tikus secara normal. Gastrium tikus bagian non-glandular disusun oleh epitel skuamus kompleks yang dilapisi kornifikasi tebal, sedangkan bagian glandular nampak tersusun oleh epitel berbentuk kolumner.

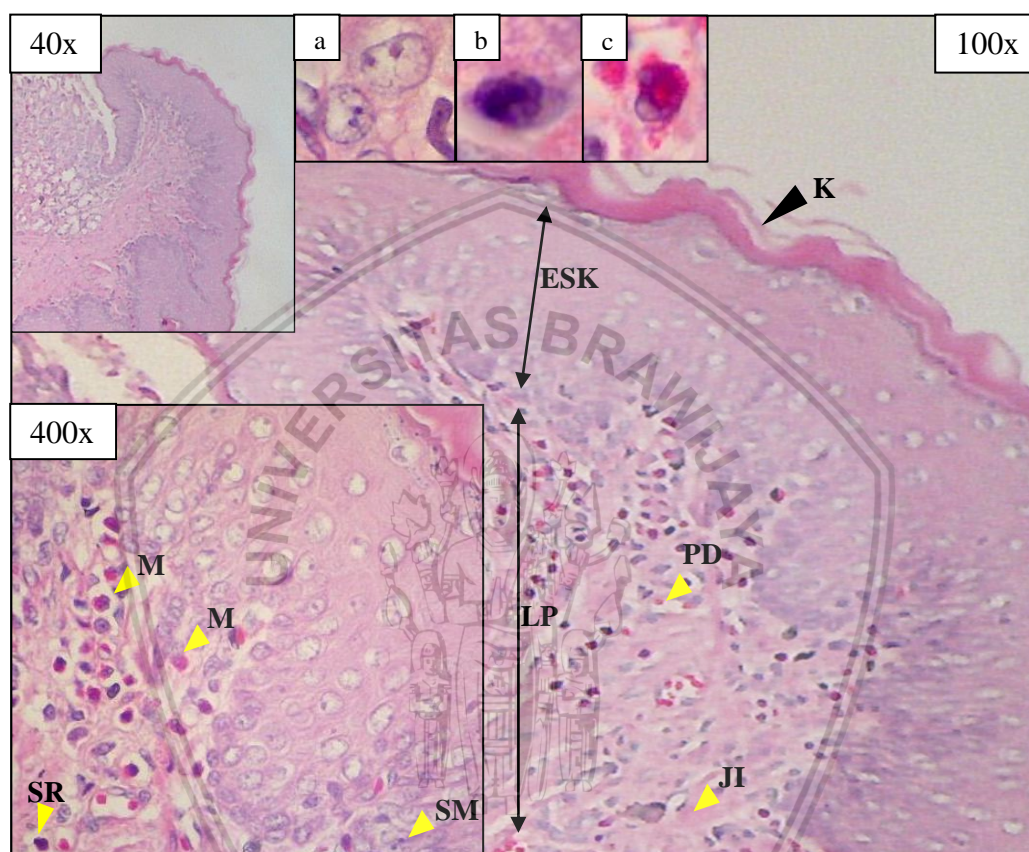
Perbedaan jenis epitel pada bagian non-glandular dan glandular pada gastrium tikus mengakibatkan adanya perbedaan fungsi dari kedua bagian tersebut. Fungsi dari gastrium non-glandular yaitu sebagai tempat penyimpanan sementara untuk makanan dan bagian glandular berperan dalam proses digesti makanan yang masuk ke dalam gastrium (Kararli, 1995).

Gambar gastrium non-glandular dari tikus kontrol negatif (**Gambar 5.4.1**) menunjukkan lapisan tunika mukosa yang ditunjukkan dengan adanya epitel skuamus kompleks berkeratin serta adanya lamina propria. Struktur dan bentuk sel

penyusun gastrium nampak terlihat jelas dan normal. Sel mitosis nampak dibagian basal dari epitel pada perbesaran 400x, dimana sitoplasma dan selubung nukleus nampak mengalami pembelahan. Lamina propria merupakan lapisan yang terletak persis dibawah dari lamina epitelial. Lamina propria nampak tersusun oleh jaringan ikat yang berbentuk seperti serabut penghubung antar sel dan pembuluh darah. Jaringan ikat berwarna merah muda akibat pewarnaan Hematoxyline-Eosin. Jaringan ikat tersusun atas fibroblast dan fibrosit yang berbentuk pipih dengan inti sel yang berbentuk oval cenderung pipih berada ditengah. Pembuluh darah nampak ditemukan diantara jaringan ikat dan disusun oleh selapis sel skuamus yang membentuk saluran dan didalamnya terdapat sel eritrosit berwarna merah. Sel radang berupa makrofag terlihat berada diantara jaringan ikat, dengan ciri morfologi sel yang cenderung bulat-oval, inti sel terletak dipinggir, sitoplasma berwarna merah dan nampak memenuhi setengah hingga dua pertiga sel. Secara keseluruhan, struktur penyusun organ gastrium pada gastrium non-glandular milik tikus kontrol negatif dapat terlihat dengan jelas. Gambaran mengenai struktur gastrium non-glandular yang didapat dari **Gambar 5.4.1** sesuai pernyataan Banks (1993), mengenai lamina propria beserta penyusunnya. Sel radang secara normal dapat ditemukan pada kondisi hewan sehat, namun dengan jumlah yang tidak banyak.

Berdasarkan Mescher (2016), epitel penyusun gastrium akan diganti setiap 4-7 hari melalui proses mitosis. **Gambar 5.4.1**, menunjukkan sel bermitosis dengan ciri terlihat pembelahan membran nukleus dan sitoplasma yang berdasarkan literatur dari Bavle (2014), termasuk mitosis pada fase telophase.

Telophase pada pewarnaan Hematoxyline-Eosin, memiliki ciri terjadinya sitokinesis (pembelahan sitoplasma), rekonstitusi nukleus, membran nukleus, dan hilangnya spindel mitotik pada sel epitel bagian basal.



**Gambar 5.4.1** Histopatologi bagian non-glandular milik tikus kontrol negatif. Sel-sel penyusun gastrium terlihat jelas. Keratin (K) nampak normal, epitel skuamus kompleks (ESK) nampak normal dengan adanya (a) sedikit sel mitosis (SM). Lamina propria (LP) nampak normal, pembuluh darah (PD) dalam keadaan normal, jaringan ikat (JI) nampak normal, serta sel radang (SR) seperti (b) neutrofil dan (c) makrofag (M) ada dalam jumlah normal. Preparat diberi pewarnaan Hematoxyline Eosin (HE) dengan perbesaran 40x, 100x dan 400x.

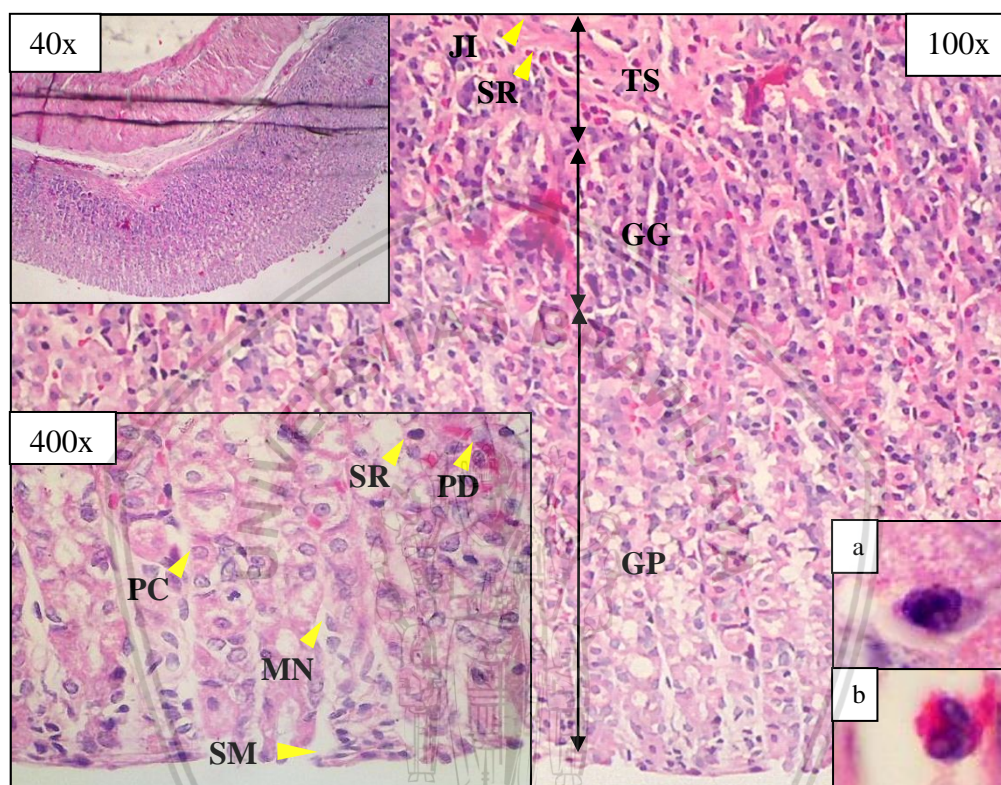
Gambaran histopatologi gastrium pada bagian glandular (**Gambar 5.4.2**) dengan perbesaran 40x menunjukkan empat tunika yang dimiliki oleh gastrium yaitu tunika mukosa, submukosa, muskularis dan serosa. Gambar perbesaran 100x menunjukkan bagian tunika mukosa dan submukosa. Gambaran histopatologi



gastrium glandular menampakkan struktur sel yang nampak normal, karena sel dapat diidentifikasi dengan baik dan dalam keadaan baik dan tidak terdapat kerusakan pada sel. Tunika mukosa bagian glandular gastrium nampak tersusun oleh epitel kolumnar simpleks yang merupakan sel sekretori bernama *surface mucus cell*. Epitel kolumnar simpleks nampak memiliki struktur sel seperti persegi panjang, dengan inti sel berwarna ungu berbentuk oval, yang pada beberapa sel nampak memiliki nukleolus. Nukleolus nampak seperti titik kecil berwarna ungu. Tunika mukosa bagian glandular, nampak memiliki saluran yang menjorok ke bagian dalam dan menjauhi lumen, bentukan tersebut dinamakan dengan *gastric pits*. Saluran *gastric pits* akan berhubungan dengan *gastric glands* yang tersusun atas beberapa jenis sel seperti *mucous neck cell*, dan sel parietal. Sel radang dan pembuluh darah dapat ditemukan pada lamina epitelial. Sel radang berbentuk bulat cenderung oval, dengan warna sel ungu. Pembuluh darah nampak berada disela-sela dari *mucous neck cell*. Tunika submukosa nampak tersusun oleh jaringan ikat yang memiliki bentuk sel yang pipih dengan inti sel nampak ditengah. Struktur yang ditemukan pada **Gambar 5.4.2** sesuai pernyataan dari Mescher (2008), yang mengatakan bahwa organ gastrium disusun oleh tunika mukosa, submukosa, muskularis dan serosa. Tunika mukosa disusun oleh lamina epitelial, lamina propria dan lamina muskularis mukosa. Epitel penyusun gastrium glandular adalah kolumnar simpleks. Lamina propria gastrium berada disela-sela *mucous neck cell* dan tersusun atas jaringan ikat, pembuluh darah, dan sel radang. Tunika mukosa organ gastrium tersusun oleh jaringan ikat, sel radang dan pembuluh darah. Makrofag dalam pewarnaan HE menunjukkan inti sel berbentuk



menyerupai kacang dengan warna ungu serta memiliki sitoplasma berwarna merah muda. Neutrofil nampak memiliki sitoplasma berwarna ungu dengan inti sel warna ungu berlobus.



**Gambar 5.4.2** Histopatologi bagian glandular milik tikus kontrol negatif. Kondisi normal dengan struktur sel dapat diidentifikasi dengan baik. Tunika mukosa (TM) tersusun atas *gastric pit* (GP) dan *gastric gland* (GG), yang tersusun oleh *surface mucus cell* (SM), *mucous neck cell* (MN) dan *parietal cell* (PC) yang dalam kondisi normal. Sel radang (SR) dan pembuluh darah (PD) dalam keadaan normal. (a) Sel radang yang ditemukan berupa neutrofil dan (b) makrofag dalam jumlah normal. Tunika submukosa (TS) dalam keadaan normal dan nampak tersusun oleh jaringan ikat (JI) dan sel radang yang normal. Pewarnaan Hematoxylin Eosin (HE) dengan perbesaran 40x, 100x dan 400x.

*Gastric pits* yang didapat pada **Gambar 5.4.2** sesuai dengan pernyataan dari Tan and Lauwers (2011), *gastric pits* merupakan bagian yang menghubungkan antara *surface mucus cell* dengan bagian *gastric glands* yang tersusun atas beragam jenis sel seperti *mucous neck cell*, *parietal cell*, *chief*

(zymogenic) cell, dan enteroendocrine cell, hanya saja pada gambar dengan perbesaran 400x, chief cell dan enteroendocrine cell tidak terlihat.

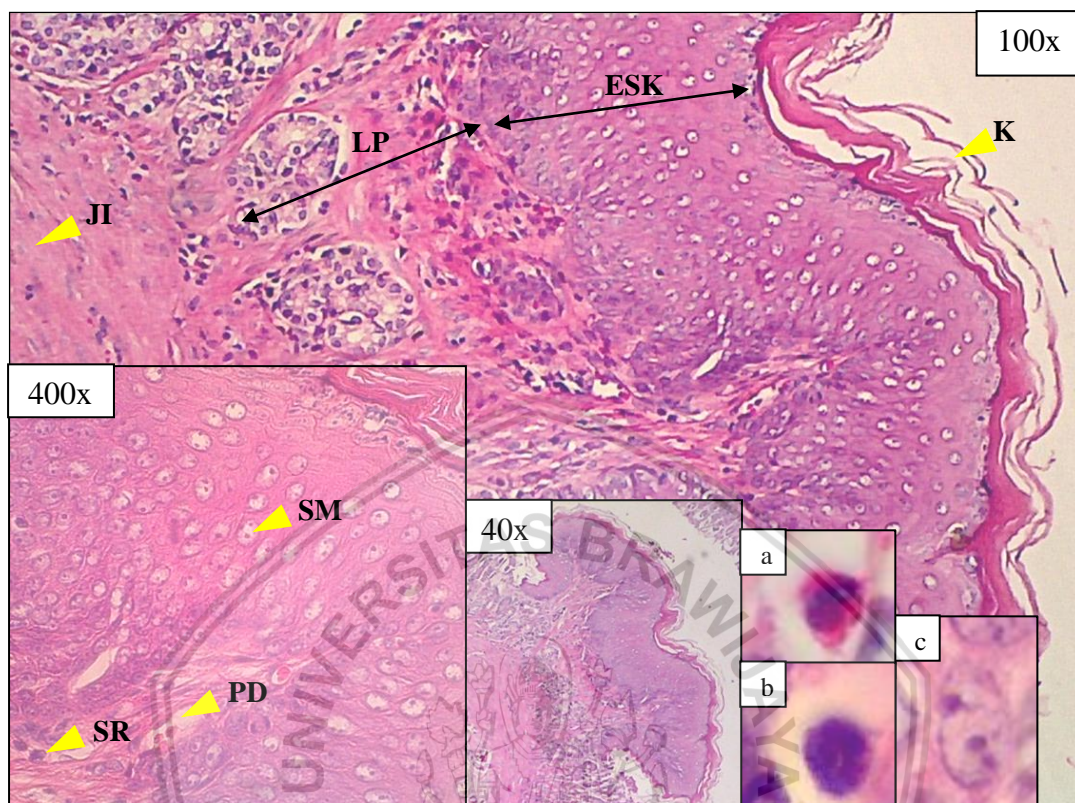
*Mucous neck cell* memiliki bentuk kolumner simplek seperti *surface mucous cell*, dengan inti sel berbentuk ireguler. *Parietal cell* nampak berukuran besar dibandingkan sel disekitarnya dengan bentuk oval cenderung ireguler, dan sitoplasma berwarna eosinofilik. Deskripsi mengenai struktur sel penyusun gastrium glandular ini sesuai dengan yang dikemukakan oleh Mescher (2008), yang menjelaskan bahwa *Surface mucus cell* memiliki bentuk kolumner dengan inti sel bulat. *Surface mucus cell* berfungsi dalam mensekresikan cairan kental mengandung ion bikarbonat untuk melindungi lapisan mukosa dari efek korosif akibat asam lambung serta menghindari efek abrasif akibat makanan. *Mucous neck cells* berstruktur epitel kolumner simpleks dengan inti sel yang bulat, granul pada sel ini mensekresikan cairan mukus bersifat alkali. *Parietal cells* merupakan sel berukuran besar berbentuk bulat atau piramidal dengan inti sel bulat sel yang menghasilkan *hydrochloric acid* (HCl). Sitoplasma yang dimiliki oleh *parietal cells* berwarna eosinofilik diakibatkan oleh tingginya densitas dari mitokondria milik *parietal cell* guna memproduksi HCl.

## B. Kelompok Kontrol Positif

Histopatologi bagian non-glandular dari hewan coba tikus kelompok kontrol positif (**Gambar 5.4.3**) dengan perbesaran 40x, 100x, dan 400x menunjukkan struktur sel yang masih baik seperti dengan kontrol negatif, karena struktur sel nampak normal dan dapat diidentifikasi dengan baik. Epitel skuamus kompleks penyusun gastrium non-glandular, nampak tersusun oleh tumpukan sel

epitel berbentuk pipih didasarnya, dan pada bagian atas terdapat keratin yang terlihat seperti serabut berwarna merah. Susunan dan struktur sel epitel tersebut mirip dengan gastrium non-glandular milik kontrol negatif (**Gambar 5.4.1**). Inti sel penyusun skuamus kompleks nampak berbentuk oval, dimana pada beberapa sel banyak memiliki nukleolus lebih dari satu. Nukleolus terlihat seperti titik-titik berwarna ungu didalam inti sel. Keberadaan nukleolus lebih dari satu didalam nukleus menandakan bahwa terdapat sel yang sedang bermitosis. Sel yang bermitosis dapat dilihat pada **gambar 5.4.3** perbesaran 400x, dan dibandingkan dengan gambar gastrium non glandular kontrol negatif (**Gambar 5.4.1**), sel yang mitosis berjumlah lebih banyak dibandingkan pada kontrol negatif. Sedikitnya jumlah sel mitosis pada kontrol negatif diakibatkan pada tikus kontrol negatif tidak mengalami infeksi, sedangkan pada kontrol positif terjadi infeksi yang mampu mengakibatkan nekrosis sehingga dapat ditemukan sel bermitosis dalam jumlah yang besar. Pernyataan ini sesuai dengan Hussein *et al.*, (2012) bahwa pemberian EPEC pada epitel gastrointestinal mampu meningkatkan jumlah sel mitosis. Hal ini diakibatkan oleh adanya protein efektor EspC berperan dalam mengakibatkan apoptosis dan nekrosis akibat infeksi EPEC (Serapio-Palacio and Navarro-Garcia, 2016).





**Gambar 5.4.3** Histopatologi bagian non-glandular milik tikus kontrol positif. Struktur sel nampak normal dan dapat diidentifikasi dengan baik. Keratin (K) dan epitel skuamus kompleks (ESK) nampak normal, namun (c) sel mitosis (SM) banyak ditemukan. Lamina proria (LP), pembuluh darah (PD) dan jaringan ikat (JI) dalam keadaan normal. Sel radang (SR) berupa (a) makrofag dan (b) neutrofil ada dalam jumlah lebih banyak dari kontrol negatif. Pewarnaan menggunakan Hematoxylin Eosin (HE) dengan perbesaran 40x, 100x dan 400x.

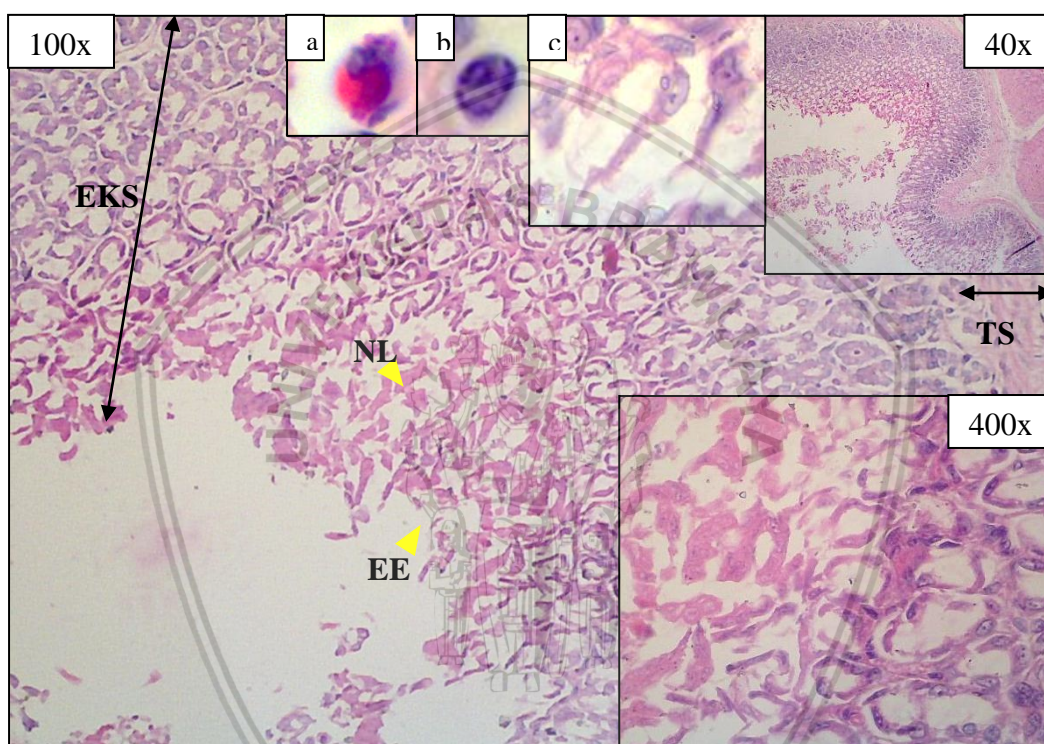
Lamina propria pada **gambar 5.4.3** nampak disusun oleh jaringan ikat yang terlihat seperti serabut berwarna merah muda, sel radang dan pembuluh darah. Sel radang pada **gambar 5.4.3** nampak tidak memiliki perbedaan jumlah yang signifikan dengan gastrium non-glandular milik kontrol negatif. Pembuluh darah nampak tersusun atas selapis sel yang berisi sel eritrosit berwarna merah. Deskripsi mengenai susunan lamina propria ini sesuai dengan penjelasan dari Mescher (2018), yang menjelaskan bahwa lamina propria tersusun atas jaringan ikat longgar, pembuluh darah dan sel radang.

**Gambar 5.4.4** menunjukkan gambaran organ gastrium bagian glandular milik hewan coba tikus kontrol positif yang diinduksi dexamethasone dan bakteri *Escherichia coli*. Perbesaran 40x menunjukkan bahwa terjadi abnormalitas pada bagian tunika mukosa, tepatnya pada bagian epitelial. Bagian permukaan epitel, nampak mengalami perubahan warna menjadi merah pucat yang terlokalisir dan kerusakan struktur sel epitel permukaan berupa erosi yang ditandai dengan rusaknya dinding sel epitel, diikuti dengan hilangnya inti sel epitel. Atropi inti sel epitel dapat teramati pada bagian batas nekrosis terhadap bagian epitel yang berbentuk normal. Atropi inti sel epitel ditandai dengan inti sel yang normalnya berbentuk bulat-oval berubah menjadi pipih, namun struktur sel masih dapat diidentifikasi.

Berdasarkan ciri yang didapat, nekrosis yang terjadi termasuk dalam kategori nekrosis liquefaktif. Nekrosis liquefaktif terjadi akibat proses kerusakan pada sel nekrosis terjadi lebih cepat dibandingkan kecepatan perbaikan sel. Nekrosis liquefaktif terjadi akibat leukosit polimorfonuklear (PMN) pada reaksi inflamasi akut yang menghasilkan hidrolase yang mampu mencerna sel-sel mati. Nekrosis yang terlokalisir ini banyak terjadi akibat infeksi bakteri (Rubin and Reisner, 2009).

Bakteri *Enteropathogenic Escherichia coli* (EPEC), diketahui berperan dalam mengakibatkan hilangnya mikrovili pada bagian permukaan epitel intestinal dan mengakibatkan perubahan protein sitoskeletal hospes sehingga terbentuk struktur *pedestal-like* pada epitel yang ditemplei oleh bakteri. Fenotip EPEC. EPEC memiliki LEE (*Locus of Enterocyte Effacement*) yang berperan

dalam mengkode *type III secretion system* (T3SS), protein yang tersekresi, protein regulator dan intimin. Molekul efektor seperti EspA, EspB, EspD dan MAP (*Mitochondrial-associated protein*), dan EspF. EspF mengganggu fungsi barier sel sehingga menginduksi terjadinya kematian sel (Kenny, 2002).



**Gambar 5.4.4** Histopatologi bagian glandular milik tikus kontrol positif. Epitel skuamus kompleks (EKS) nampak mengalami nekrosis liquefaktif (NL), yang diikuti dengan (c) erosi epitel (EE) dimana struktur epitel tidak teridentifikasi. Sel radang yang nampak adalah (a) makrofag dan (b) neutrofil dalam jumlah besar diantara EKS dan tunika submukosa (TS). Pewarnaan Hematoxylin Eosin (HE) dengan perbesaran 40x, 100x dan 400x.

Penempelan strain EPEC pada mukosa gastrointestinal mampu menginduksi diare dengan berbagai mekanisme. Bakteri menempel pada permukaan organ yang mengakibatkan penurunan jumlah area absorpsi. Bakteri EPEC juga menghambat pertukaran ion dan air. Infeksi EPEC juga



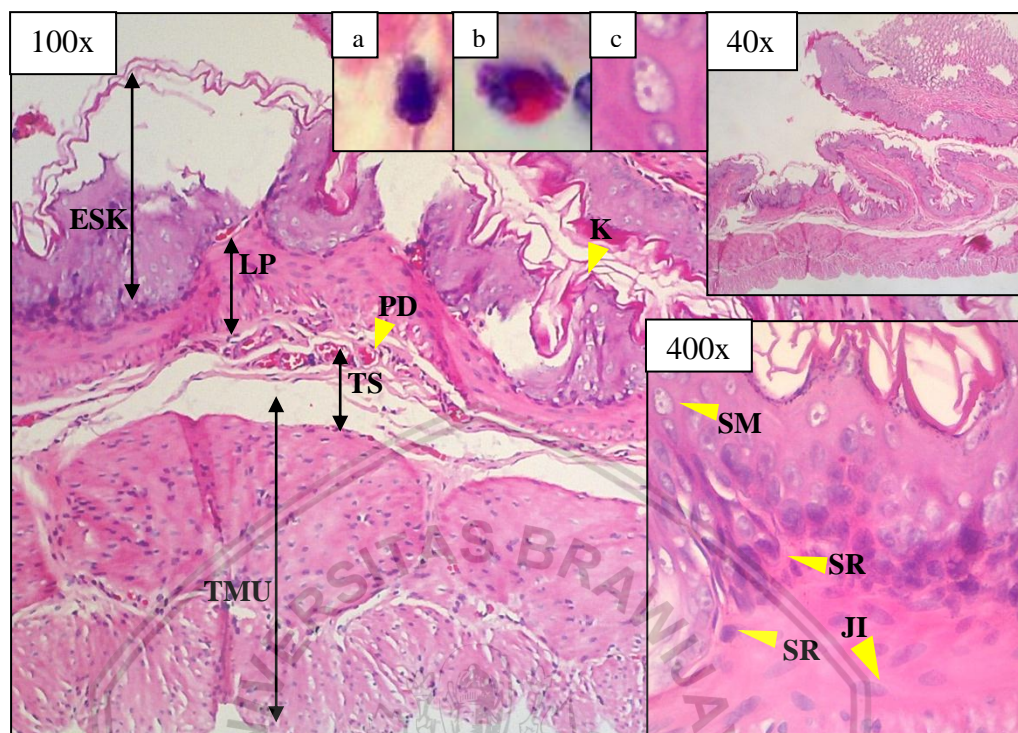
mempengaruhi integritas dari eotelial dan mengganggu fungsi barier denan mengganggu integritas dari *tight junction* sehingga barier epitelial mengalami kebocoran (Clements *et al.*, 2012).

### C. Kelompok Perlakuan 1

Gambaran histopatologi perbesaran 100x bagian non-glandular dari kelompok perlakuan 1 (**Gambar 5.4.5**) menampilkan tiga lapisan penyusun organ seperti tunika mukosa, submukosa, dan muskularis. Secara keseluruhan, struktur sel penyusun bagian non-glandular pada kelompok perlakuan 1 masih dapat diamati dengan baik, dan strukturnya mirip dengan milik kontrol positif (**Gambar 5.4.3**). Tunika mukosa bagian non-glandular milik P1 nampak disusun oleh epitel skuamus kompleks yang permukaannya dilapisi oleh keratin. Keratin yang melapisi epitel nampak lebih tipis dibanding milik kontrol positif (**Gambar 5.4.3**). Epitel skuamus kompleks nampak terpotong pada beberapa bagian yang dapat diakibatkan kesalahan pada proses pemotongan preparat. Menurut Eroschenko (2008), ketajaman pisau mikrotom mempengaruhi hasil dari pemotongan preparat.

Bagian bawah dari epitel, dapat ditemukan lamina propria dan tunika muskularis mukosa. Lamina propria nampak tersusun oleh jaringan ikat yang berbentuk serabut dengan inti sel berbentuk pipih. Sel radang dapat ditemukan berwarna ungu dengan bentuk sel cenderung bulat. Deskripsi yang didapatkan sesuai dengan Eroschenko (2008), bahwa jaringan ikat longgar berbentuk serabut dengan inti sel ditengah, sedangkan sel radang akan berwarna ungu pada pewarnaan histopatologi dengan Hematoxylene-Eosin (HE).



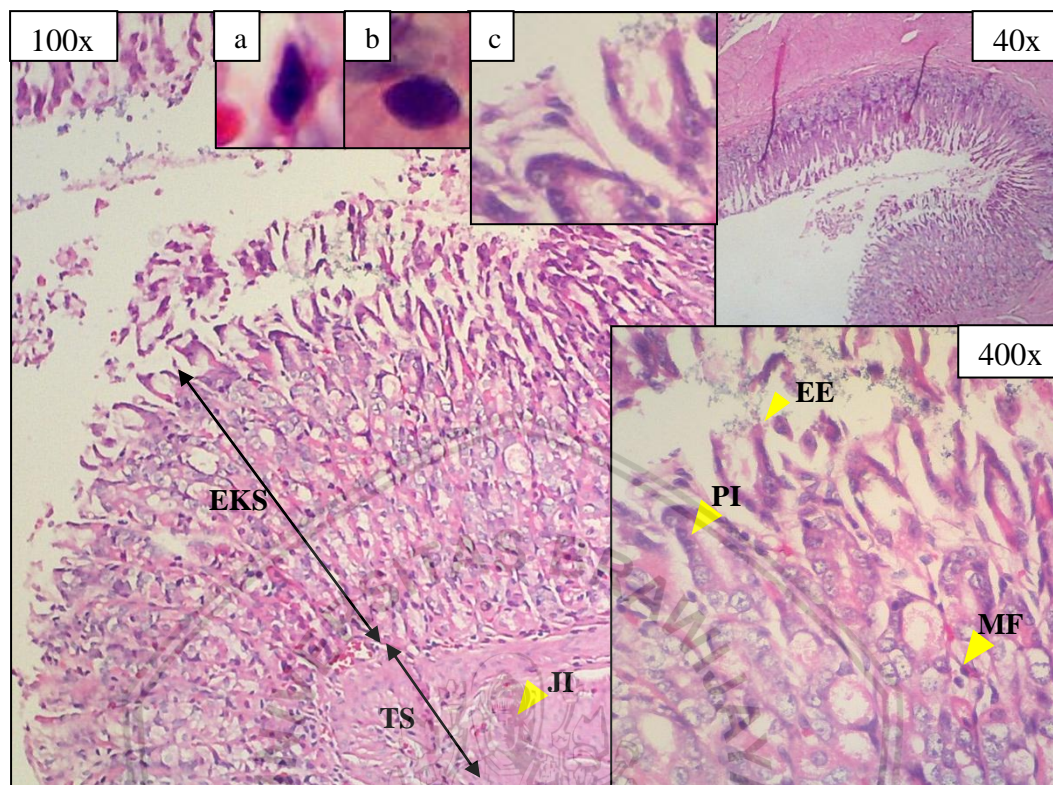


**Gambar 5.4.5** Histopatologi bagian non-glandular dari hewan coba tikus kelompok P1. Keratin (K) nampak tipis dibanding milik kontrol positif. Epitel skuamus kompleks (ESK) nampak tersusun dengan baik, meskipun terpotong di beberapa bagian. (c) Sel mitosis (SM) ada dalam jumlah normal. Sel radang (SR) dan jaringan ikat (JI) dapat ditemukan pada lamina propria. Tunika submukosa (TS) tersusun atas pembuluh darah, jaringan ikat dan sel radang. Sel radang yang nampak yaitu (a) neutrofil dan (b) makrofag. Tunika muskularis (TMU) nampak tersusun atas dua lapis sel otot. Pewarnaan Hematoxylin Eosin (HE) dengan perbesaran 40x, 100x dan 400x.

Tunika submukosa nampak tersusun oleh jaringan ikat dan pembuluh darah. Jaringan ikat pada tunika submukosa nampak terlihat seperti serabut-serabut berwarna merah. Pembuluh darah terlihat tersusun oleh selapis sel epitel, dimana pada lumen pembuluh darah ditemukan sel warna merah berbentuk bulat yang merupakan sel darah. Tunika muskularis gastrum nampak disusun oleh dua jenis sel otot. Hasil ini sesuai dengan Mescher (2016) yang mengemukakan bahwa tunika submukosa tersusun atas jaringan ikat, pembuluh darah dan sel radang. Pembuluh darah tersusun atas selapis epitel skuamus simpleks yang membentuk

lumen, yang nampak berisi sel darah. Tunika muskularis organ gastrium disusun oleh otot sirkuler dan longitudinal.

Gambaran histopatologi organ gastrium bagian glandular milik tikus P1 (**Gambar 5.4.6**) dengan perbesaran 40x, 100x dan 400x, menunjukkan adanya erosi pada bagian permukaan epitelial yang dekat dengan lumen. Erosi ini seperti yang ditemukan pada kontrol positif (**Gambar 5.4.4**) namun dengan derajat yang tidak separah milik kontrol positif. Kerusakan terjadi pada bagian *surface mucus cell* dan *mucus neck cell*. Struktur sel epitel nampak rusak, dimana inti sel menjadi pipih dan sel mengalami penyusutan. Makrofag nampak pada perbesaran 400x, berada diantara *mucus neck cell*. Erosi diakibatkan oleh leukosit polimorfonuklear (PMN) pada reaksi inflamasi akut yang menghasilkan hidrolase akibat terjadi infeksi (Rubin and Reisner, 2009). Struktur bagian dasar epitelial nampak normal dan dapat diidentifikasi. Bagian tunika submukosa pada perbesaran 100x nampak tersusun oleh jaringan ikat dan pembuluh darah. Ekstrak *green coffee* robusta dosis 500mg/kgBB yang diberikan secara peroral sebanyak 1 ml, nampak mampu mencegah kerusakan yang diakibatkan oleh gastroenteritis, meskipun erosi epitel masih terlihat.



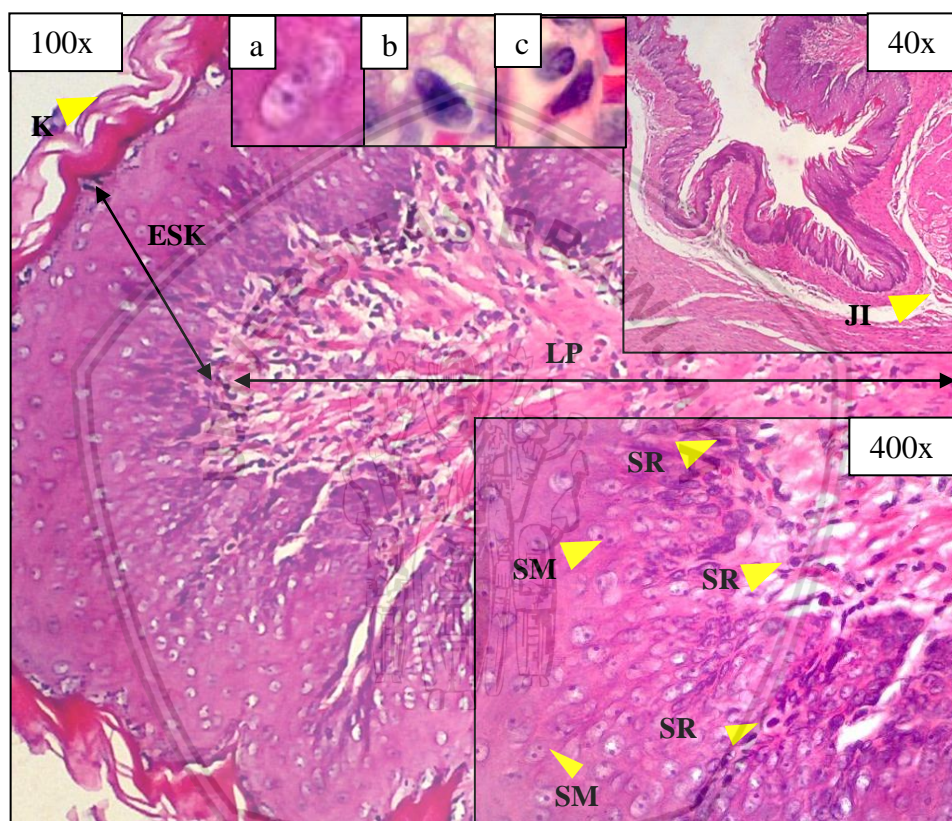
**Gambar 5.4.6** Histopatologi bagian glandular milik tikus kelompok perlakuan 1. (c) Terjadi erosi (EE) pada epitel kolumner simpleks (EKS), namun tidak separah seperti pada kontrol positif. Terjadi piknosis (PI) pada inti sel. (a) Sel radang berupa makrofag (MF) dan (b) neutrofil nampak terlihat dalam jumlah besar pada EKS dan tunika submukosa (TS). Jaringan ikat nampak dalam kondisi normal. Pewarnaan Hematoxylene Eosin (HE) dengan perbesaran 40x, 100x dan 400x.

#### D. Kelompok Perlakuan 2

Gambaran histopatologi bagian non-glandular tikus P2 (**Gambar 5.4.7**) perbesaran 100x menunjukkan bagian tunika mukosa, yang tersusun dari epitel skuamus kompleks berkeratin serta lamina propria. Keratin nampak tebal seperti pada gambaran pada kontrol negatif (**Gambar 5.4.1**). Epitel skuamus kompleks nampak seperti tumpukan sel dengan bentuk beragam yang pada bagian basal tersusun oleh epitel skuamus. Sel radang warna ungu dan berbentuk bulat, dapat ditemukan pada perbesaran 400x dibagian dasar sel epitel. Lamina propria



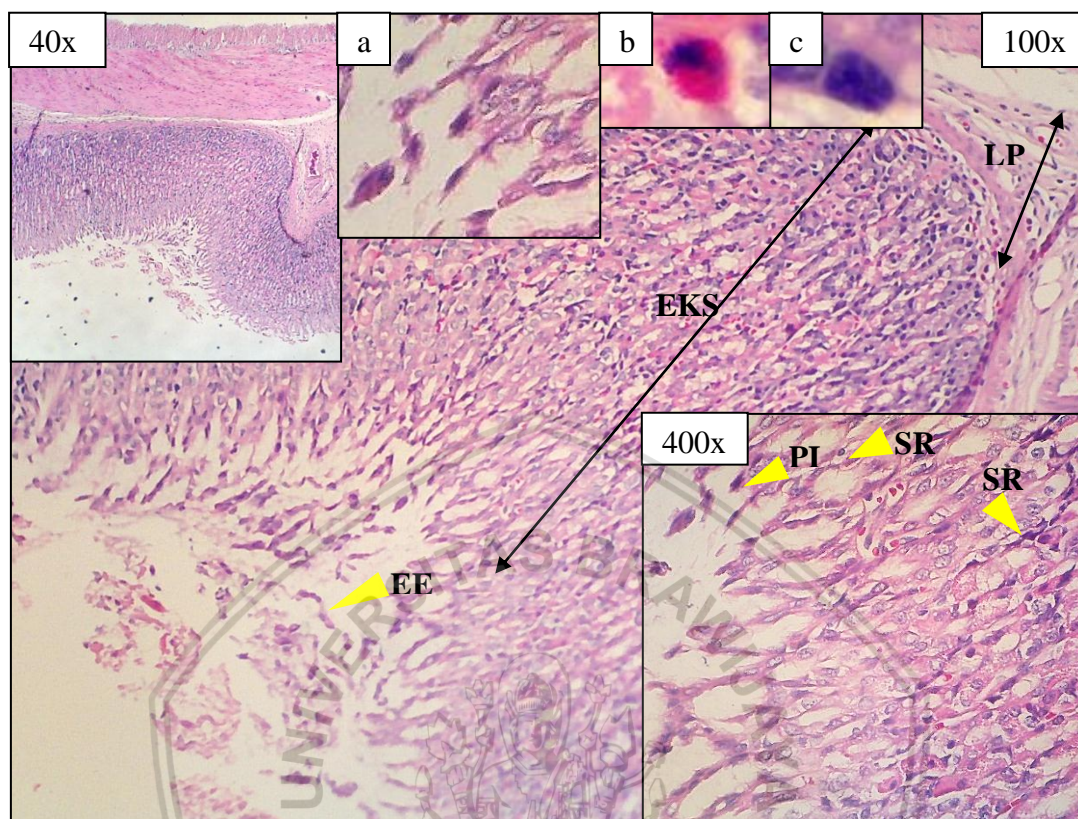
nampak tersusun oleh jaringan ikat, yang memiliki inti sel berbentuk pipih yang terletak ditengah yang sesuai dengan pernyataan Eroschenko (2008), bahwa jaringan ikat longgar berbentuk serabut dengan inti sel ditengah, sedangkan sel radang akan berwarna ungu pada pewarnaan histopatologi dengan Hematoxylene-Eosin (HE).



**Gambar 5.4.7** Histopatologi bagian non-glandular dari hewan coba tikus P2. Keratin (K) dalam kondisi normal dan tebal. Epitel skuamus kompleks (ESK) memiliki kondisi yang normal namun pada bagian basal nampak terlihat sel radang (SR). Sel radang yang nampak berupa (b) neutrofil dan (c) makrofag dalam jumlah yang banyak. (a) Sel mitosis (SM) banyak terlihat pada ESK. Lamina propria tersusun atas jaringan ikat (JI) dengan kondisi normal, dan terdapat banyak sel radang. Pewarnaan Hematoxylene-Eosin (HE) dengan perbesaran 40x, 100x dan 400x.

Gambaran histopatologi bagian glandular milik tikus P2 (**Gambar 5.4.8**), dengan perbesaran 40x memiliki struktur yang baik, namun terlihat terdapat bagian epitel yang terlepas dari epitel kolumnar simpleks. Perbesaran 100x menunjukkan bahwa pada bagian *surface mucus cell* terjadi erosi epitel dimana struktur sel rusak dan inti sel tidak dilindungi oleh membran sel. Perbesaran 400x menunjukkan bahwa kerusakan terjadi hingga *mucus neck cell*, sel parietal dan pembuluh darah, dimana struktur sel mengalami sedikit perubahan bentuk namun masih dapat diidentifikasi. Bentuk inti sel dari *surface mucus cell* mengalami perubahan bentuk menjadi oval dengan warna inti mengalami penggelapan dan penyusutan inti. Berdasarkan Rubin and Reisner (2009), penggelapan dan penyusutan warna pada inti sel disebut piknosis.

Tikus kelompok P2 diberi ekstrak *green coffee* robusta dengan dosis 1000mg/kgBB sebanyak 1 ml secara peroral menampakkan perbaikan ketebalan keratin pada **gambar 5.4.7**, namun erosi epitel masih terjadi seperti yang dapat dilihat pada **gambar 5.4.8**.



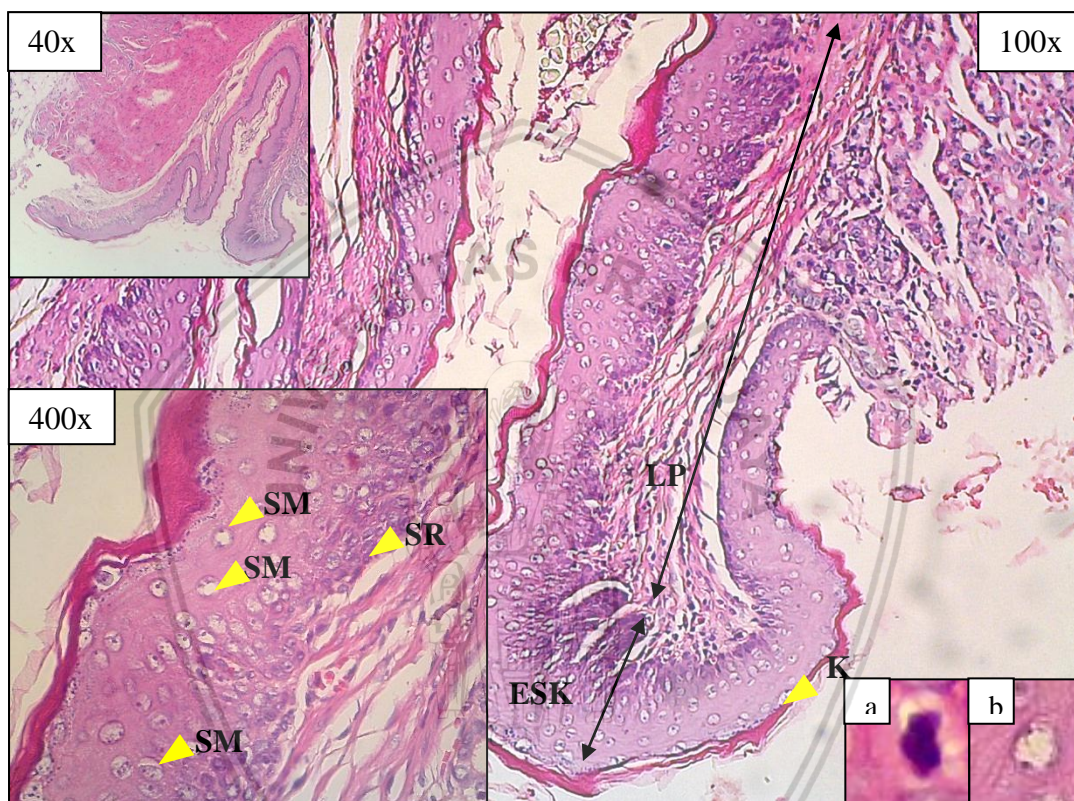
**Gambar 5.4.8** Histopatologi bagian glandular gastrium milik tikus kelompok P2. Epitel skuamus kompleks (EKS) mengalami erosi epitel (EE) dan piknosis (PI) pada inti selnya. EE yang terjadi derajatnya lebih kecil dari kontrol positif dan P1. Sel radang (SR) nampak berada diantara EKS namun dalam jumlah yang kecil. Sel radang berupa makrofag dan neutrofil yang jumlahnya lebih sedikit dari kontrol positif. Pewarnaan Hematoxylene-Eosin (HE) dengan perbesaran 40x, 100x dan 400x.

### E. Kelompok Perlakuan 3

**Gambar 5.4.9** menunjukkan bagian non-glandular organ gastrium milik tikus kelompok perlakuan 3. Tikus pada kelompok perlakuan 3 mendapat perlakuan berupa pemberian ekstrak *green coffee* Robusta dengan dosis 1500mg/kgBB, dexamethasone dosis 5mg/kgBB dan diinfeksi bakteri *Escherichia coli*  $3 \times 10^8$  CFU. Perbesaran 100x pada **gambar 5.4.9** menunjukkan bagian dari tunika mukosa. Tunika mukosa tersusun dari epitel skuamus kompleks berkeratin dan lamina propria. Keratin pada P3 tampak dalam keadaan normal. Epitel



skuamus kompleks nampak normal dengan struktur sel penyusun yang dapat diidentifikasi, namun dapat terlihat sel radang dan sel bermitosis dalam jumlah yang sedikit dibandingkan pada milik kontrol positif. Jaringan ikat penyusun lamina propria nampak normal.

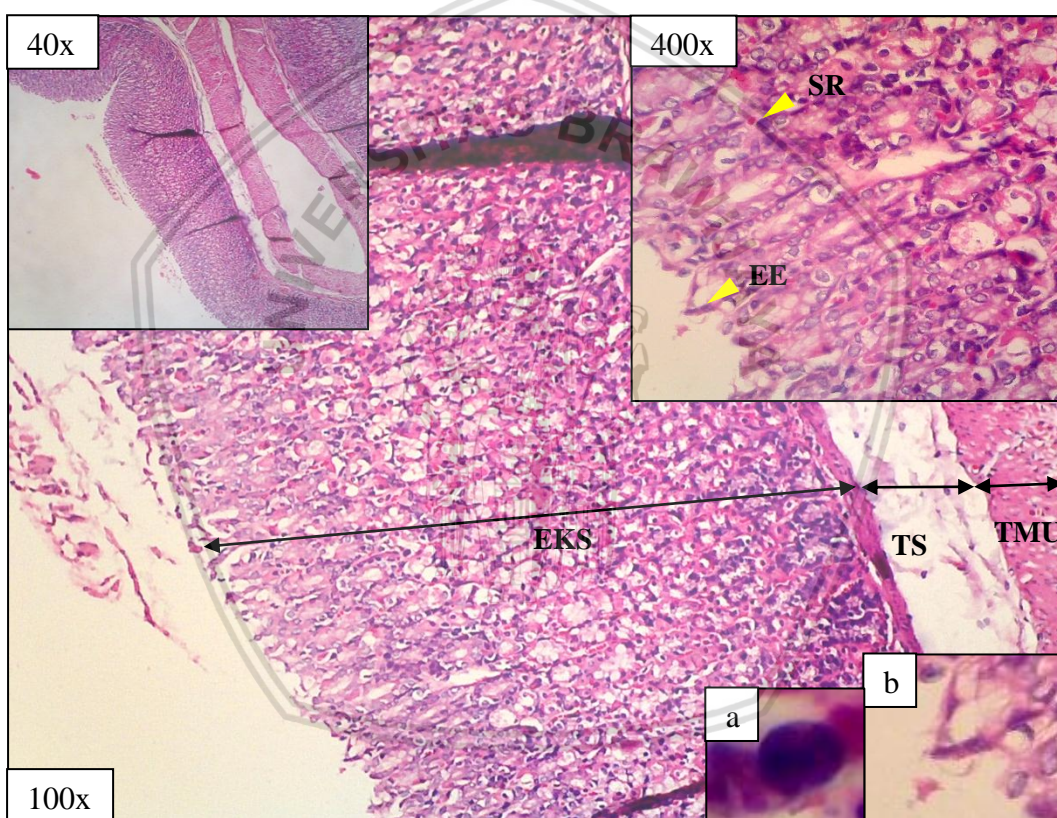


**Gambar 5.1.9** Histopatologi bagian non-glandular milik tikus kelompok perlakuan 3. Keratin (K) tampak normal. Epitel skuamus kompleks (ESK) nampak normal, pada bagian basal ditemukan sel radang (SR) dan sel bermitosis (SM). (a) Sel radang yang nampak berupa neutrofil dalam jumlah sedikit. (b) Sel bermitosis nampak dalam jumlah kecil. Lamina propria (LP) nampak normal. Pewarnaan preparat menggunakan Hematoxyline-Eosin (HE) dengan interpretasi menggunakan perbesaran 40x, 100x dan 400x.

Gambaran histopatologi bagian glandular milik tikus kelompok perlakuan 3 (**Gambar 5.4.10**) menunjukkan struktur sel yang nampak jelas dan dapat diidentifikasi. Epitel kolumnar simpleks pada bagian permukaan yang disusun oleh *surface mucus cell* mengalami erosi. Erosi yang terlihat pada kelompok



perlakuan 3 ini memiliki derajat yang kecil dibandingkan dengan bagian glandular milik kontrol positif (**Gambar 5.4.4**). Sel lain penyusun pada epitel skuamus kompleks, seperti *mucous neck cell* dan sel parietal nampak normal dengan struktur yang dapat diidentifikasi dengan baik. Sel radang dapat ditemukan diantara *mucous neck cell*, dengan ciri sel berbentuk bulat dan inti sel berlobus nampak berwarna ungu. Pembatas antar *mucus neck cell* nampak jelas terlihat.



**Gambar 5.4.10** Histopatologi bagian glandular milik tikus kelompok perlakuan 3. (a) Epitel kolumner simpleks (EKS) bagian permukaan mengalami erosi epitel (EE) dengan derajat kecil dibandingkan dengan kontrol positif. Sel lain penyusun tunika mukosa nampak normal. Tunika submukosa (TS) dan tunika muskularis (TMU) terlihat normal. (a) Sel radang (SR) seperti neutrofil mengalami penurunan jumlah dibandingkan dengan milik kontrol positif. (b) Erosi epitel (EE) nampak dalam skala kecil dibanding kontrol positif dan kelompok perlakuan lainnya. Pewarnaan preparat menggunakan Hematoxyline-Eosin (HE) dengan interpretasi menggunakan perbesaran 40x, 100x dan 400x.

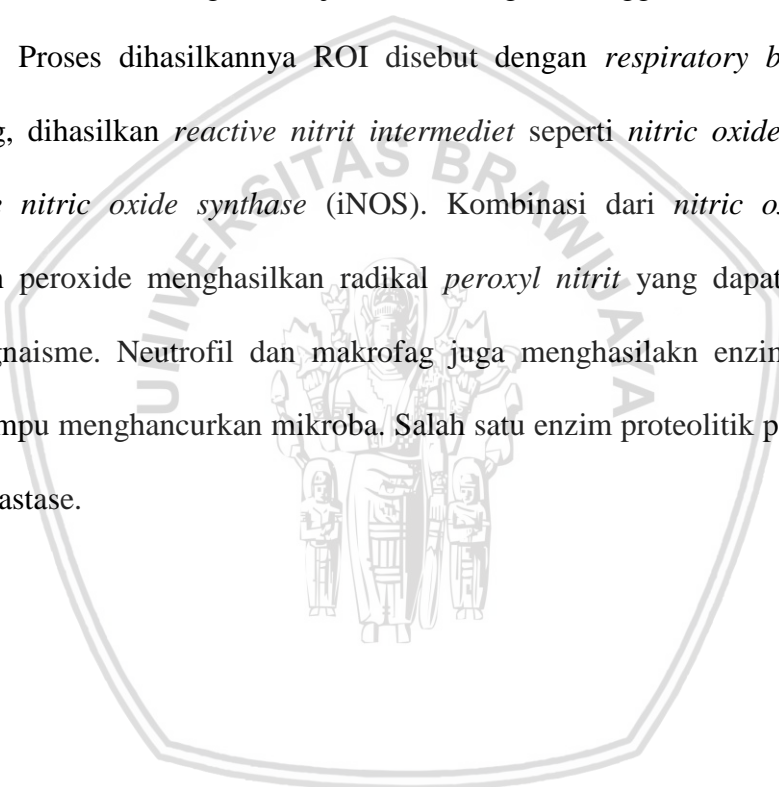
*Chlorogenic acid* (CGA) mampu berperan sebagai antimikroba, anti-inflamasi dan antioksidan. Bakteri *E.coli* yang memiliki endotoksin berupa lipopolisakarida (LPS) akan dikenali sebagai antigen dan menimbulkan reaksi inflamasi. CGA yang mampu berperan sebagai antiinflamasi akan bekerja dengan mempengaruhi faktor transkripsi NF-kB yang merupakan regulator dari sitokin pro-inflamasi, kemokin dan molekul adhesi (Liang *and* Kitts, 2016). CGA mampu menurunkan peningkatan COX-2 yang diakibatkan oleh LPS. Penurunan COX-2 mampu menurunkan produksi prostaglandin (Shan, 2009). Penurunan prostaglandin, serta terhambatnya NF-kB, mampu mengakibatkan terhambatnya respon inflamasi.

CGA berperan sebagai antimikroba dengan cara meningkatkan permeabilitas dari plasma membran dan membran luar bakteri, yang mengakibatkan terganggunya fungsi barier sehingga sel bakteri mengalami pecah dan mati (Lou *et al.*, 2011)

CGA mampu berperan sebagai antioksidan yang melindungi dari reaksi oksidasi dengan meningkatkan faktor transkripsi nukleus yang berperan dalam ekspresi enzim antioksidan. CGA juga mampu meringankan dan mencegah akumulasi dari MDA (Liang *and* Kitts, 2016).

Bakteri *Escherichia coli*  $3 \times 10^8$  CFU yang diinfeksi pada tikus kelompok kontrol positif dan perlakuan, akan melakukan adhesi pada epitelial gastrum yang mengakibatkan penurunan jumlah area epitelial yang dapat berfungsi normal. Makrofag residen yang mengenali adanya antigen berupa LPS, menghasilkan sitokin pro-inflamasi seperti TNF, IL-1 dan chemokin yang mengakibatkan

datangnya leukosit pada daerah inflamasi. LPS milik bakteri *E.coli* akan berikatan dengan TLR-4 yang mengakibatkan neutrofil dan makrofag menelan mikroba kedalam vesikel. Proses menelan mikroba ini disebut fagositosis. Neutrofil dan makrofag yang teraktifasi akan membunuh mikroba dengan memproduksi molekul mikrobisidal dan fagolisosom. Makrofag dan neutrofil teraktivasi mengubah molekul oksigen menjadi ROI dengan menggunakan enzim fagosit oksidase. Proses dihasilkannya ROI disebut dengan *respiratory burst*. Dalam makrofag, dihasilkan *reactive nitrit intermediat* seperti *nitric oxide* oleh enzim *inducible nitric oxide synthase* (iNOS). Kombinasi dari *nitric oxide* dengan hydrogen peroxide menghasilkan radikal *peroxyl nitrit* yang dapat membunuh mikroorganisme. Neutrofil dan makrofag juga menghasilkan enzim proteolitik yang mampu menghancurkan mikroba. Salah satu enzim proteolitik pada neutrofil adalah elastase.



### **5.5 Pengaruh Preventif Ekstrak *Green Coffee Robusta (Coffea canephora)* terhadap Aktivitas Protease Gastrium Hewan Tikus yang Diinduksi Gastroenteritis Bakterial**

Enzim protease merupakan enzim yang berperan dalam reaksi pemecahan protein dengan menghidrolisa ikatan peptida pada molekul protein menjadi peptida atau asam amino. Protease berperan dalam sejumlah reaksi biokimia seluler seperti degradasi protein, mekanisme patogenitas, proses koagulasi darah, proses pasca translasi protein dan mekanisme ekspresi protein ekstraseluler. Enzim protease adalah komponen dari sel PMN, monosit dan makrofag (Chakraborti and Dhalla, 2017). Enzim protease juga dimiliki oleh bakteri, contohnya *Escherichia coli*. Bakteri *E.coli* strain EPEC memiliki enzim protease yang berfungsi dalam proses invasi terhadap hospes. Contoh enzim protease milik EPEC yaitu ekstraselular protease, NleC, NleD, EspC dan OmpT (Budiarti dan Mubarik, 2007; Clements *et al.*, 2012; Serapio-Palacio and Navarro-Garcia, 2016; Thomassin *et al.*, 2012).

Aktivitas protease adalah jumlah enzim yang diperlukan untuk menghasilkan 1  $\mu\text{mol.mL}$  tirosin tiap menit pada suhu yang optimum (Wati dkk., 2013). Aktivitas protease pada gastrium masing-masing kelompok hewan coba diuji homogenitas dan normalitas. Data menunjukkan bahwa ( $p>0,05$ ) sehingga dilanjutkan dengan *One Way ANOVA*. Hasil uji *One Way ANOVA* dari aktivitas protease gastrium menunjukkan hasil perbedaan yang tidak signifikan antar perlakuannya ( $p>0,05$ )(**lampiran 9**)



Hasil analisa secara statistik *One Way Analysis of Variance* (ANOVA) menggunakan software SPSS 25.0 menunjukkan bahwa aktivitas protease pada tikus (*Rattus norvegicus*) gastroenteritis bakterial tidak mengalami penurunan yang signifikan akibat pemberian ekstrak *green coffee* robusta ( $p>0,05$ ). Penurunan nampak terjadi pada kelompok perlakuan 3 yang diberi *green coffee* robusta sebanyak 1500mg/kgBB namun dalam jumlah yang tidak signifikan yaitu sebesar 27,01%.

Aktivitas protease pada kelompok kontrol negatif yang didapat sebesar  $4,22 \pm 1,11$   $\mu\text{mol.mL}/\text{menit}$ . Hasil aktivitas protease milik kontrol negatif ini bahkan lebih tinggi dibandingkan milik tikus kontrol positif, kelompok perlakuan 1, 2, dan 3. Kelompok kontrol positif memiliki aktivitas protease sebesar  $3,72 \pm 0,57$   $\mu\text{mol.mL}/\text{menit}$ , kelompok perlakuan 1 memiliki aktivitas protease sebesar  $4,09 \pm 1,11$   $\mu\text{mol.mL}/\text{menit}$ , kelompok perlakuan 2 memiliki aktivitas protease sebesar  $3,09 \pm 1,48$   $\mu\text{mol.mL}/\text{menit}$ , dan kelompok perlakuan 3 memiliki aktivitas protease sebesar  $3,08 \pm 1,21$   $\mu\text{mol.mL}/\text{menit}$ . Aktivitas protease digunakan sebagai indikator adanya kerusakan yang disebabkan oleh radikal bebas. Radikal bebas dihasilkan secara normal pada tubuh akibat reaksi biokimia dalam proses metabolisme sel. Tubuh memiliki sistem pertahanan terhadap radikal bebas secara alami yang disebut dengan antioksidan endogen, yaitu superoksida dismutase (SOD), katalase dan glutathion peroksidase (Chakraborti and Dhalla, 2017). Kelompok tikus kontrol negatif yang memiliki kadar aktivitas protease yang tinggi sedangkan pada kelompok ini tidak diberikan paparan infeksi bakteri dapat diakibatkan oleh stress. Stress adalah respon normal tubuh terhadap stimulus atau

stressor yang mengganggu homeostatis tubuh (Darma, 2000). Stressor yang memungkinkan pada hewan coba adalah faktor handling dan restrain, faktor lingkungan seperti suhu, bising, pakan, minum dan alas kandang (Howard *et al.*, 2011). Faktor stress dapat berpengaruh pada produksi ROS di gastrium. Mekanisme stress juga dapat disebabkan oleh penurunan aliran darah mukosa pada gastrium sehingga terjadi iskemia dan difusi balik dari asam lambung. Difusi balik dari asam lambung terjadi saat ion  $H^+$  yang dilepaskan via transport membran ditarik kembali dan menyebabkan keadaan asam pada mukosa gastrium, sehingga mampu meningkatkan ROS (Jia *et al.*, 2007). ROS menyebabkan terjadinya peroksidasi lipid dan aktivasi dari NF-kB yang akan meningkatkan pelepasan dari sitokin pro-inflamasi yang dapat berpengaruh dalam peningkatan produksi protease (Chakraborti *and* Dhalla, 2017).

Aktivitas protease milik kontrol positif yang diberi bakteri *Escherichia coli* di dapati hasil  $3,72 \pm 0,57 \mu\text{mol.mL/menit}$ . Aktivitas protease milik kontrol positif ini secara signifikan mengalami penurunan dibandingkan milik kontrol negatif. Pemberian bakteri akan mengakibatkan degradasi mucus oleh enzim protease ekstraseluler milik bakteri. Respon inflamasi yang terjadi pada gastrium mampu meningkatkan ROS. Peningkatan ROS akan mengaktifasi NF-kB yang akan menyebabkan dilepaskannya sitokin pro inflamasi sehingga terjadi proses inflamasi yang menghasilkan enzim protease. Selain itu terdapat enzim protease lainnya yang berasal dari bakteri yang mampu mempengaruhi kadar aktivitas protease seperti NleC, NleD, EspC dan OmpT (Budiarti dan Mubarik, 2007;

Abbas *and* Litchman, 2005; Clements *et al.*, 2012; Serapio-Palacio *and* Navarro-Garcia, 2016; Thomassin *et al.*, 2012).

Penurunan sebesar 11,85% dibandingkan dengan kontrol negatif, dapat diakibatkan oleh infeksi bakteri sehingga terjadi kerusakan sel penyusun organ gastrium. Organ gastrium tersusun oleh empat tunika, dimana pada tunika mukosa yang terdiri dari sel-sel epitel, dihasilkan beberapa jenis enzim protease. Enzim protease yang dihasilkan oleh gastrium yaitu pepsinogen dan cathepsin. Sel epitel gastrium menghasilkan cathepsin, pepsinogen dihasilkan oleh sel parietal yang akan teraktivasi menjadi pepsin oleh asam lambung (Taylor, 1959). Berdasarkan gambaran histopatologi gastrium glandular kontrol positif (**Gambar 5.4.4**) nampak bahwa terjadi kerusakan parah pada sel epitel penghasil protease oleh nekrosis liquefaktif. Kerusakan parah mengakibatkan sel epitel tidak mampu menghasilkan enzim protease secara normal, sehingga hasil aktivitas protease yang di dapat dari organ kontrol positif mengalami penurunan.

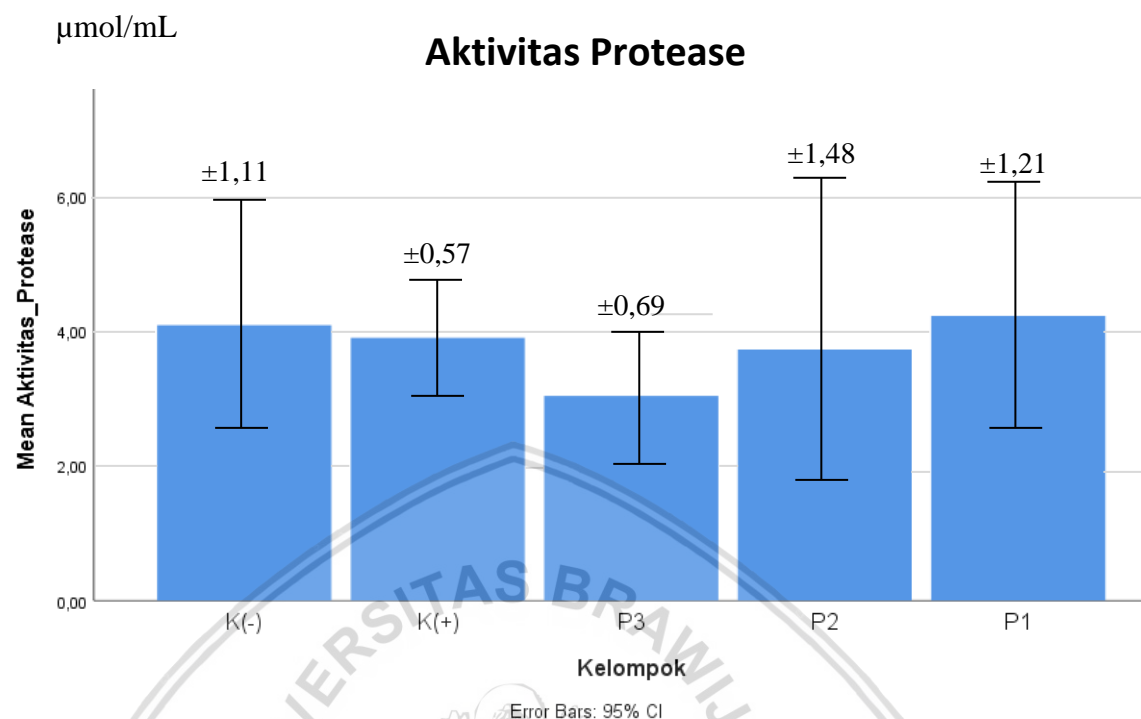
Aktivitas protease pada kelompok terapi 1 dengan dosis 500mg/kgBB adalah  $4,09 \pm 0,69 \mu\text{mol.mL/menit}$ , dengan presentase penurunan aktivitas protease sebesar 3,08% terhadap kontrol negatif. Hasil analisa dengan ANOVA menunjukkan bahwa kelompok terapi 1 tidak berbeda secara signifikan ( $p>0,05$ ) terhadap kelompok kontrol negatif dan positif yang dinyatakan dalam notasi yang sama. Hasil tersebut dapat diakibatkan oleh dosis 500mg/kgBB dari ekstrak *green coffee* robusta terlalu kecil sehingga belum mampu menurunkan aktivitas protease.

Aktivitas protease pada kelompok terapi 2 dengan dosis 1000mg/kgBB yaitu  $3,90 \pm 1,48 \mu\text{mol.mL/menit}$ , dengan presentase penurunan aktivitas protease



sebesar 7,58% terhadap kontrol negatif. Hasil analisa dengan ANOVA menunjukkan bahwa kelompok terapi 1 tidak berbeda secara signifikan ( $p>0,05$ ) terhadap kelompok kontrol negatif dan positif yang dinyatakan dalam notasi yang sama.

Aktivitas protease pada kelompok terapi 3 dengan dosis 1500mg/kgBB adalah  $3,08 \pm 1,21 \mu\text{mol.mL/menit}$ , dengan presentase penurunan aktivitas protease sebesar 27,01% terhadap kontrol negatif. Hasil analisa dengan ANOVA menunjukkan bahwa kelompok terapi 1 tidak berbeda secara signifikan ( $p>0,05$ ) terhadap kelompok kontrol negatif dan positif yang dinyatakan dalam notasi yang sama. Namun aktivitas protease milik kelompok perlakuan 3 menghasilkan data aktivitas protease terendah dibandingkan dengan kelompok kontrol dan perlakuan lainnya. Penurunan sebesar 27,01% pada kelompok perlakuan 3 diduga karena kandungan CGA pada *green coffee* yang berperan sebagai antioksidan. CGA sebagai antioksidan bekerja dengan cara menangkap radikal bebas yang dihasilkan dari proses kerusakan akibat *E.coli*, radikal bebas tersebut kemudian didonorkan atom hidrogen yang berasal dari gugus hidroksil milik CGA, sehingga gugus hidroksil menjadi stabil dan proses kerusakan lipid pada gatrium dapat berkurang ((Liang and Kitts, 2016). Gugus hidroksil yang stabil dapat menghambat aktivitas NF- $\kappa$ B yang merupakan faktor transkripsi dari sitokin proinflamasi (Shan, 2009).



**Gambar 5.5.11** Histogram Aktivitas Protease

Dosis terapi yang digunakan adalah dosis bertingkat, yaitu peningkatan dosis 1 ke 2 adalah 100% dan dosis 2 ke dosis 3 adalah 50% atau tiga kali dosis 1. Dosis terapi 1, 2, dan 3 tidak memberi pengaruh yang signifikan terhadap penurunan aktivitas protease dari gastroenteritis bakterial. Penurunan yang masih belum signifikan, menandakan bahwa dosis lebih tinggi dapat menurunkan aktivitas protease.

**Tabel 5.5** Rata-rata Aktivitas Protease  $\pm$  SD

Kelompok Perlakuan	Rata-Rata Aktivitas Protease ( $\mu\text{mol.mL}/\text{menit}$ )	Penurunan Aktivitas Protease (%)
Kelompok Kontrol (-)	$4,22 \pm 1,11$	-
Kelompok Kontrol (+)	$3,72 \pm 0,57$	11,85%
Kelompok P1 (dosis 500mg/kgBB)	$4,09 \pm 0,69$	3,08%
Kelompok P2 (dosis 1000mg/kgBB)	$3,90 \pm 1,48$	7,58%
Kelompok P3 (dosis 1500mg/kgBB)	$3,08 \pm 1,21$	27,01%

Konsentrasi substrat juga menjadi penyebab perubahan aktivitas protease. Pada konsentrasi substrat rendah, enzim tidak mencapai konversi maksimum akibat sulit menemukan substrat yang dapat direaksikan. Seiring dengan meningkatnya konsentrasi substrat, kecepatan reaksi juga akan meningkat akibat makin cepatnya substrat terikat pada enzim. Peningkatan konsentrasi pada titik jenuh tidak lagi dapat meningkatkan laju reaksi (Pratiwi, 2008).

pH lingkungan juga dapat mempengaruhi kecepatan aktivitas enzim dalam mengkatalisa suatu reaksi. Hal ini disebabkan konsentrasi ion hidrogen mempengaruhi struktur tiga dimensi enzim dan aktivitasnya. Setiap enzim memiliki pH optimum dimana pada pH tersebut struktur tiga dimensinya paling kondusif untuk mengikat substrat. Bila konsentrasi ion hidrogen berubah dari konsentrasi optimal, aktivitas enzim secara progresif hilang sampai pada akhirnya enzim menjadi tidak fungsional (Lehninger *et al.*, 2005).

Adanya senyawa penghambat enzim (inhibitor) dapat mempengaruhi aktivitas protease. Inhibitor dapat bersaing dengan substrat untuk berikatan dengan sisi aktif enzim sehingga dapat terjadi pengurangan laju reaksi. Inhibitor biasanya menyerupai substrat normal dengan bentuk tiga dimensinya, sehingga enzim dapat berikatan dengan inhibitor (Pratiwi, 2008).

Bioavailabilitas dari suatu ekstrak berkisar kurang dari 1%. Bioavailabilitas obat yang diberikan secara oral dipengaruhi oleh penyerapan pada dinding usus dan metabolisme oleh jaringan intestinal dan liver (Freter *et al.*, 1983). Aktivitas pada kontrol positif seharusnya meningkat dibandingkan dengan kontrol negatif, tetapi pada hasil pengukuran aktivitas protease, kontrol positif,

mengalami penurunan. Infeksi bakteri *E.coli* pada kontrol positif secara oral tidak berpengaruh terhadap kadar protease gastrum, hal ini didukung oleh Zhu *et al.* (2006), yang menyatakan bahwa Bakteri *E.coli* yang diberikan dalam media PBS melalui sonde lambung, hanya bertahan selama 5 menit dan akan mati setelahnya. Kematian bakteri diakibatkan oleh pH asam yang rendah yaitu dibawah 2,5.



## BAB 6 PENUTUP

### 6.1 Kesimpulan

Berdasarkan hasil penelitian yang telah dilakukan dapat diambil kesimpulan bahwa pemberian preventif ekstrak *green coffee* Robusta (*coffea canephora*) mampu memberikan efek perbaikan pada histopatologi organ gastrium, pada dosis 1500 mg/kgBB, sedangkan dengan pemberian ekstrak *green coffee* Robusta (*coffea canephora*) dengan rentang dosis 500-1500 mg/kgBB belum mampu menurunkan aktivitas protease secara signifikan pada gastrium milik tikus yang mengalami gastroenteritis bakterial.

### 6.2 Saran

Diperlukan penelitian lebih lanjut mengenai patogenitas bakteri *Escherichia coli* strain EPEC saat berada dalam gastrium, serta diperlukan penelitian lanjutan untuk mengetahui dosis optimum dari ekstrak *green coffee* Robusta (*coffea canephora*) untuk penanganan gastroenteritis bakterial.

## DAFTAR PUSTAKA

- Abbas, A.K., and A.H. Litchman. 2005. *Cellular and Molecular Immunology*. Fifth edition. Elsevier. Saunders. Philadelphia. 263-288
- Akbar, B. 2010. *Tumbuhan dengan Kandungan Senyawa Aktif yang Berpotensi sebagai Bahan Antifertilitas*. Adabia Press. Jakarta. 4-5
- Astawan, M., T. Wresdiyati, I.I. Arief, dan E. Suhesti. 2011. Gambaran Hematologi Tikus Putih (*Rattus norvegicus*) yang Diinfeksi *Escherichia coli* Enteropatogenik dan Diberikan Probiotik. *Media Peternakan*. 1(34): 8
- Banks, W.J. 1993. *Applied Veterinary Histology*. 3<sup>rd</sup> edition. Mosby. St. Louis. 34-36
- Bavle, R.M. 2014. Mitosis at a Glance. *J Oral Maxillofac Pathol*. 18:52-55
- Bergmeyer, H.U. 2012. *Methods Enzymatic Analysis*. Volume 4. Verlag Chemie Weinheim Academic Press, Inc. Bergstr
- Betz, C.L. 2002. *Buku Saku Keperawatan Pediatri (Mosby's Pediatric Nursing Reference)*. Edisi 3. EGC. Jakarta
- Boone, D.R., D.H. Bergey, and G.M. Garrity. 2001. *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*. Springer. Berlin
- Braude, A.I., C.E. Davis, and J. Fierer. 1986. *Infectious Disease and Medical Microbiology*. Volume II. Saunders. Philadelphia. 659
- Budiarti, S., dan N.R. Mubarik. 2007. Extracellular Protease Activity of Enteropathogenic *Escherichia coli* on Mucin Substrate. *HAYATI Journal of Biosciences*. 14(1): 36-38
- Cappiello, A. 2007. *Advance in LC-MS instrumentations*. Elsevier. Oxford.
- Cakrawardi, E. Wahyudin dan Bachtiar. 2011. Pola Penggunaan Antibiotik pada Gastroenteritis Berdampak Diare Akut Pasien Anak Rawat Inap di Balai Layanan Umum Rumah Sakit Dr. Wahidin Sudirohusodo Makassar Selama 2009. *Majalah Farmasi dan Farmakologi*. 15(2): 69-72
- Caroff, D.A., P.H. Edelstein, K. Hamilton, D.A. Pegues, and P.H. Giligan. 2014. The Bristol Stool Scale and Its Relationship to *Clostridium difficile* infection. *J. Clin. Microbiol*. 52(9) : 3437-3439



- Chakraborti, S., and N.S. Dhalla. 2017. *Proteases in Physiology and Pathology*. Springer. Singapore
- Chotiah, S. 2012. Strategi Pengendalian Diare Bakterial pada Anak Sapi Potong. *JITV*. 17(3):234-243
- Clements, A., J.C. Young, N. Constatinou and G. Frankel. 2012. Infection Strategies of Enteric Pathogenic *Escherichia coli*. *Gut Microbes*. 3(2): 71-87
- Coutinho, A.E., and K.E. Chapman. 2011. The Anti-Inflammatory and Immunosuppressive Effects of Glucocorticoids, Recent Developments and Mechanistic Insights. *Mol Cell Endocrinol*. 335(1):2-13
- Dos Santos, M.D., M.C. Almeida, N.P. Lopes, and G.E. de Souza. 2006. Evaluation of The Anti-Inflammatory, Analgesic and Antipyretic Activities of The Natural Polyphenol Chlorogenic Acid. *Biol Pharm Bull*. 29(11): 2236-40
- Ellis, H. 2011. Anatomy of the Stomach. *Surgery – Oxford International Edition*. 29 (11): 541-543
- Eroschenko, L.W.W. 2008. *DiFiore's Atlas of Histology*. Lippincott William and Wilkins. Boston.
- Farah, A., T. de Paulis, L.C. Trugo, and P.R. Martin. 2005. Effect of Roasting on the Formation of Chlorogenic Acid Lactones in Coffee. *J Agric Food Chem*. 53(5):1505-13
- Farah, A., and M.D. Carmen. 2006. Phenolic Compounds in Coffee. *Braz. J. Plant Physiol*. 18(1): 23-36
- Farah, A. 2012. *Coffee: Emerging Health Effects and Disease Prevention*. Wiley-Blackwell. Oxford.
- Farhaty, N., dan Muchtaridi. 2017. Tinjauan Kimia dan Aspek Farmakologi Senyawa Asam Klorogenat pada Biji Kopi: Review. *Farmaka*. 4(3): 1-4
- Freter, R., H. Brickner, J. Fekete, M.M Vickerman and K.E. Carey. 1983. Survival and Implantation of *Escherichia coli* in the Intestinal Tract. *Infect Immun*. 39(2): 686-703
- Gani, N., L.I. Momuat, dan M.M. Pitoi. 2013. Profil Lipida Plasma Tikus Wistar yang Hiperkolesterolemia pada Pemberian Gedi Merah (*Abelmoshus manihot* L.). *Jurnal Mipa Unsrat*. 2(1): 44-49

- Gunawardene, A.R, B.M Corfe, and C.A Staton. 2011. Classification and Functions of Enteroendocrine Cells of the Lower Gastrointestinal Tract. *Int J Exp Pathol*. 92(4):219-31
- Harinaldi. 2005. *Prinsip-Prinsip Statistik untuk Teknik dan Sains*. Erlangga. Jakarta. 18
- Havelaar, A.H., J. Garssen, M.A. Koedam, J.B. Dufrenne, F.M. van Leusden, L. de la Fonteyne, J.T. Bousema, and J.G. Vos. 2001. A Rat Model for Dose-Response Relationships of *Salmonella enteritidis* Infection. *Journal of Applied Microbiology*. 91: 442-452
- Haq, M.R., S.H. Ansari, and A. Rashikh. 2013. *Coffea Arabica* seed extract stimulate the cellular immune function and cyclophosphamide-induced immunosuppression in mice. *Iran J Pharm Res*. 12: 101-108
- Hecimovic, I., A. Belscak-Cvitanovic, D. Horzic, and D. Komes. 2011. Comparative Study of Polyphenols and Caffeine in Different Coffee Varieties Affected by The Degree of Roasting. *Food Chemistry*. 129:911-1000
- Hwang, S.J., Y.W. Kim, Y. Park, H.J. Lee, and K.W. Kim. 2014. Anti-inflammatory effects of chlorogenic acid in lipopolysaccharide-stimulated RAW 264.7 cells. *Inflamm Res*. 63(1) : 81-90
- Info Medion. 2011. Gangguan Pencernaan Akibat Infeksi Bakteri. <https://info.medion.co.id/broiler/penyakit/600-gangguan-pencernaan-akibat-infeksi-bakteri.html> [11 Januari 2018]
- International Coffee Organization. 2016. Country Data on the Global Coffee Trade. [https://www.ico.org/profiles\\_e.asp](https://www.ico.org/profiles_e.asp) [10 Januari 2017]
- Janvier Labs. 2017. Wistar Rat. <https://www.janvier-labs.com/rodent-research-models-services/research-models/per-species/outbred-rats/product/wistar.html> [11 Januari 2018]
- Junqueira, L., and J. Carneiro. 2006. *Basic Histology: Text & Atlas*. 11<sup>th</sup> edition. McGraw-Hill. New York
- Kararli, T.T. 1995. Comparison of the Gastrointestinal Anatomy, Physiology, and Biochemistry of Humans and Commonly used Laboratory Animals. *Biopharm Drug Dispos*. 16(5):351-80
- Kartasmita, R.E., dan S. Addyantina. 2012. Dekafeinasi Biji Kopi Robusta (*Coffea canephora* L.) Menggunakan Pelarut Polar (Etanol dan Metanol). *Acta Pharmaceutica Indonesia*. XXXVII (3): 83-89

- Keshav, S., and E. Culver. 2011. *Gastroenterology: Clinical Cases Uncovered*. Willey-Blackwell. Oxford. 76
- Kenny, B., S. Ellis, A.D. Leard, J. Warawa, H. Mellor, and M.A. Jepson. 2002. Co-ordinate Regulation of Distinct Host Cell Signalling Pathways by Multifunctional Enteropathogenic *Escherichia coli* effector molecules. *Mol Microbiol.* 44:1095-1107
- Kreicbergs, V., F. Dimins, V. Mikelsons, and I. Cinkmanis. 2011. Biologically Active Compounds in Roasted Coffee. *Foodbalt*. Latvia University of Agriculture Departement of Chemistry. <http://llu.lv/conference/foodbalt/2011/FOODBALT-Proceedings-2011-110-115.pdf> [11 Januari 2018]
- Krogfelt, K.A. 1991. Bacterial Adhesion: Genetics, Biogenesis, and Role in Pathogenesis of Fimbrial Adhesins of *Escherichia coli*. *Rev Infect Dis.* 13(4): 721-735
- Kumar, V., A.K. Abbas, N. Fausto, and R. Mitchell. 2010. *Basic Pathology 8<sup>th</sup> Edition*. Elsevier Saunders Inc. China.
- Laurence, D.R., and A.L. Bacharach. 1964. *Evaluation of Drug Activities: Pharmacometrics*. London Academic Press.
- Tan, D., and Lauwers, G.Y. 2011. *Advances in Surgical Pathology: Gastric Cancer*. Lippincot William and Wilkins. Houston
- Taylor, W.H. 1959. The Proteolytic Activity of Human Gastric Juice and Pig and Calf Gastric Mucosal Extract Below pH 5. *Biochem.* 71(3):73
- Law, D. 1988. Virulence Factors of Enteropathogenic *Escherichia coli*. *Journal of Medical Microbiology.* 26:1-10
- Layton, L.L., R. Panzani, F.C. Greene, and J.W. Corse. Atopic Hypersensitivity to a Protein of the Green Coffee Bean and Absence of Allergic Reactions to Chlorogenic Acid, Low-Molecular-Weight Components of Green Coffee, or to Roasted Coffee. *Int Arch Allergy.* 28:116-127
- Lehninger, A.L., D.L. Nelson, and M.M. Cox. 2005. *Lehninger Principles of Biochemistry*. New York: W.H Freeman Publisher
- Luciano, L., and E. Reale. 1992. The "Limiting Ridge" of The Rat Stomach. *Arch Histol Cytol.* (55): 131-138

- Maenza, R. M., D. W. Powell, G. R. Plotkin, S. B. Formal, H. R. Jervis, and H. Sprinz. 1970. Experimental Diarrhea : *Salmonella enterocolitis* in the Rat. *The Journal of Infectious Diseases*. 121 (5): 475
- Mahadevan, V. 2014. Anatomy of the Stomach. *Surgery – Oxford International Edition*. 32 (11): 571-574
- Malole, M.B.M., dan S.U. Pramono. 1989. *Penggunaan Hewan-Hewan Percobaan di Laboratorium*. Pusat Antar Universitas Bioteknologi IPB. Bogor
- Mattjik, A.A., dan M. Sumertaya. 2006. *Perancangan Percobaan dengan Aplikasi SAS dan Minitab*. Jilid I. IPB Press. Bogor. 53
- Matsukura, N., A. Shirota, and G. Asano. 1997. Anatomy, Histology, Ultrastructure, and Stomach of Rat. *Monographs on Pathology of Laboratory Animals*. Springer. Berlin
- Mescher, A.L. 2018. *Junqueira's Basic Histology*. Mc Graw Hill Education. San Fransisco
- Mills, S.E., D. Carter, J.K. Greenson. V.E. Reuter, and M.H. Stoler. 2004. *Sternberg's Diagnostic Surgical Pathology*. Fifth edition. Lippincott Williams & Wilkins. Philadelphia.
- Muntiha, M. 2001. Teknik Pembuatan Preparat Histopatologi dari Jaringan Hewan dengan Pewarnaan Hematoksilin dan Eosin (H&E). *Temu Teknis Fungsional Non Peneliti*. Bogor
- Mushtaq, N., M.B. Redpath, J.P. Luzio, and P.W. Taylor. 2005. Treatment of Experimental *Escherichia coli* Infection with Recombinant Bacteriophage-derived Capsule Depolymerase. *Journal of Antimicrobial Chemoteraphy*. 56:160-165
- Nawari. 2010. *Analisis Statistik dengan MS Excel 2007 dan SPSS 17*. Elex Media Komputindo. Jakarta. 187
- Palmer, T. 1991. *Understanding Enzymes*. 3<sup>rd</sup> edition. Ellis Horwood Limited. Chichester.
- Parker, G.A., C.A. Picut, and C. Swanson. 2016. *Atlas of Histology of the Juvenile Rat*. Elsevier. North Carolina. 147-153
- Pasaribu, J., L. Loho, dan P. Lintong. 2013. Gambaran Histopatologi Lambung Tikus Wistar (*Rattus norvegicus*) yang Diberikan Lengkuas (*Alpinia*

*galanga*) Setelah diinduksi oleh Asam Mefenamat. *Jurnal e-Biomedik (eBM)*. 1(1) : 402-407

Plumb, D.C. 2011. *Plumb's Veterinary Drug Handbook*. 7<sup>th</sup> edition. Wiley Blackwell. Oxford.

Poliana, J., and A.P. MacCabe. 2007. *Industrial Enzyme: Structure, Function, and Applications*. Springer. Dordrecht.

Pratisto, A. 2004. *Cara Mudah Mengatasi Masalah Statistik dan Rancangan Percobaan dengan SPSS 12*. Elex Media Komputindo. Jakarta. 170

Pratiwi, S.T. 2008. *Mikrobiologi Farmasi*. Erlangga. Jakarta

Pudjiatmoko, S. Nurtanto, N. Lubis, Syafrison, S. Yulianti, D. Kartika, C.K Yohana, E. Setianingsih, Nurhidayah, D. Efendi, E. Saudah, I. Tjahajati, Gunanti, Suwarno, A. Sutisna, S. Widjajanti, D. Polrianto, A. Lestariningsih, Sunarno, R. Darmayanti, A. Wardhana, dan P.M. Widiyanti. 2014. *Manual Penyakit Hewan Mamalia*. Cetakan ke-2. Kementrian Direktorat Jendral Peternakan dan Kesehatan Hewan. Kementrian Pertanian. Jakarta. 199-122

Rahardjo, P. 2012. *Kopi*. Penebar Swadaya. Jakarta. 7-38

Rao, M.B., A.M. Tanksale, M.S. Ghatge, and VV. Deshpande. 1998. Molecular and Biotechnological Aspect of Microbial Proteases. *Microbiol Mol Biol Rev*. 62(3):597-635

Ranuh, R., M.S. Subijanto, S. Ingrid, dan Aulanni'am. 2008. The Role of Probiotic *Lactobacillus Plantarum* IS 20506 on Occludin and ZO-1 of Intestinal Tight Junctions Rehabilitation. Makalah Seminar Nasional Basic Science. Universitas Brawijaya. Malang

Rubin, E. and Reisner, D.S. 2009. *Clinicopathologic Foundations of Medicine*. Wolters Kluwers. Philadelphia.

Ruedas, A.R. 2016. The IUCN Red List of Threatened Species: *Rattus norvegicus*. <http://www.iucnredlist.org/details/summary/19353/0> [11 Januari 2018]

Sadikin, M. 2002. *Biokimia Enzim*. Jakarta: Widya Medika

Sarwono, J. dan H. Budiono. 2012. *Statistik Terapan: Aplikasi Riset Skripsi, Tesis dan Disertasi*. Elex Media Komputindo. Jakarta. 8-98

Sedlacek, H.H., and T. Mörröy. 1995. *Immune Reaction*. Springer. Berlin. 237



- Serapio-Palacios, A., and F. Navarro-Garcia. 2016. EspC, an Autotransporter Protein Secreted by EPEC, Causes Apoptosis dan Necrosis through Caspase and Calpain Activation, Including Direct Procaspase-3 Cleavage. *mBio*. 7(3):e00479-16
- Setyono, J., D.A. Nugroho, Mustofa, dan Saryono. 2014. Efek Orlistat, Ekstrak Biji Kopi Hijau, dan Kombinasinya Terhadap Kadar Adiponektin dan Profil Lipid. *Jurnal Ners*. 9(1): 26-34
- Shan, J., J. Fu, Z. Zhao, Z. Kong, H. Huang, L. Luo, and Z. Yin. 2009. Chlorogenic Acid Inhibits Lipopolysaccharide-Induced Cyclooxygenase-2 Expression in RAW264.7 cell through suppressing NF- $\kappa$ B and JNK/AP-1 activation. *International Immunopharmacology*. 9: 1042-1048
- Shin, H.S., H. Satsu, M.J. Bae, Z. Zhao, H. Ogiwara, M. Totsuka, and M. Shimizu. 2015. Anti-inflammatory Effect of Chlorogenic Acid on the IL-8 Production in Caco-2 cells and The Dextran Sulphate Sodium-Induced Colitis Symptoms in C57BL/6 Mice. *Food Chemistry*. 168: 167-175
- Soehono, L.A. 2016. *Pengantar Perancangan Percobaan: Suatu Pendekatan Praktis Analisis Data Menggunakan Software Genstat*. UB Press. Malang. 50
- Soenarto, S.S. 2011. Vaksin Rotavirus untuk Pencegahan Diare. *Buletin Jendela Data & Informasi Kesehatan*. 2(2): 33
- Spitalnik, P.F. 2016. Histology Laboratory Manual 2016-2017. <http://histologylab.ccnmtl.columbia.edu/HistologyLabManual.pdf> [11 Maret 2018]
- Steenport, M., K.M.F. Khan, B. Du, S.E. Barnhard, A.J. Dannenberg, and D.J. Falcone. 2009. Matrix Metalloproteinase (MMP)-1 and MMP-3 Induce Macrophage MMP-9: Evidence for the Role of TNF- $\alpha$  and Cyclooxygenase-2. <http://www.jimmunol.org/> [5 Februari 2018]
- Sugiyama, K., T. Cho, M. Tatewaki, S. Onishi, T. Yokoyama, N. Yoshida, T. Fujimatsu, H. Hirata, T. Fukuda, and Yasutsugu Fukushima. 2015. Anaphylaxis Due to Caffeine. *Asia Pac Allergy*. 5(1):55-56
- Sugiyono, 2007. *Statistika untuk Penelitian*. Alfabeta. Bandung. 29
- Sulaiman, S.M., G. Rajashekhar, P.J. Prasakh, D.S. Singh, and C. Saleem. 2010. Immunoprophylactic Activity of Immunol, a Polyherbal Formulation Against Dexamethasone Induced Immunosuppression in Rats. *Journal of Pharmacology and Toxicology*.

- Tarmudji. 2003. Kolibasilosis Pada Ayam: Etiologi, Patologi dan Pengendaliannya. *Wartazoa*. 3(2) : 65-66
- Thomassin, J.L., J.R. Brannon, B.F. Gibbs, S. Gruenheid, and H. Lee-Moual. 2012. OmpT Outer Membrane Proteases of Enterohemorrhagic and Enteropathogenic *Escherichia coli* Contribute Differently to The Degradation of Human LL-37. *Infect Immun*. 80(2):483-492
- Torres, A.G., Z. Zhou, and J.B. Kaper. 2005. Adherence of Diarrheagenic *Escherichia coli* Strain of Epithelial Cells. *Infect Immun*. 73(1): 18-29
- Upa, F.T, Saroyo, dan D.Y. Katili. 2017. Komposisi Pakan Tikus Ekor Putih (*Maxomys hellwandii*) di Kandang. *Jurnal Ilmiah Sains*. 17(1): 7-9
- Wati, I.R. , Aulanni'am, dan C. Mahdi. 2013. Aktivitas Protease dan Gambaran Histologi Ginjal Tikus Putih (*Rattus norvegicus*) Pasca Induksi Cyclosporine-A. *Kimia Student Journal*. 1(2) : 257-263
- Vdoviaková, K., E. Petrovov, M. Maloveská, L. Krešáková, J. Teleky, M.Z.J. Elias, and D. Petrášová. 2016. Surgical Anatomy of The Gastrointestinal Track and Its Vasculature in the Laboratory Rat. *Gastroenterology Research and Practice*.
- Vinerean, H.V. 2017. Rats – Biology & Husbandry. Laboratory of Animal Research of Veterinary Medicine. Florida International University. <http://research.fiu.edu/ored/lar/> [19 Februari 2018]
- Vulcano, A.B., M. Tino-De-Franco, J.A. Amaral, O.G. Ribeiro, W.H.K. Cabrera, M. A. Bordenalli, C.B. Carbonare, E.P. Alvares, and S.B. Carbonare. 2014. Oral Infection with Enteropathogenic *Escherichia coli* Triggers Immune Response and Intestinal Histological Alterations in Mice Selected for Their Minimal Acute Inflammatory Responses. *Microbiol Immunol*. 58: 356
- Washabau, R., and M.J. Day. 2012. *Canine & Feline Gastroenterology*. Saunders. Philadelphia. 54-55
- Wiseman, A.C. 2016. Immunosuppressive Medication. *Clin J Am Soc Nephrol*. 11(2)-332-343
- Zitka, O.J. Kukacka, S. Krizkova, D. Huska, V. Adam, M. Masarik, R. Prusa, and R. Kizek. 2010. Matrix Metalloproteinases. *Current Medicinal Chemistry*. 17(31): 3751-3759

Zhu, H., C.A. Hart, D. Sales, and N.B. Roberts. 2006. Bacterial killing in gastric juice-effect of pH and pepsin on *Escherichia coli* and *Helicobacter pylori*. *Journal of Medical Microbiology*. (55): 1265-1270



### Lampiran 1. Sertifikat Layak Etik



**KOMISI ETIK PENELITIAN  
UNIVERSITAS BRAWIJAYA**

**KETERANGAN KELAIKAN ETIK  
"ETHICAL CLEARENCE"**

No: 894-KEP-UB

KOMISI ETIK PENELITIAN (ANIMAL CARE AND USE COMMITTEE)  
UNIVERSITAS BRAWIJAYA  
TELAH MEMPELAJARI SECARA SEKSAMA RANCANGAN PENELITIAN YANG  
DIUSULKAN, MAKA DENGAN INI MENYATAKAN BAHWA:


PENELITIAN BERJUDUL : EFEK PREVENTIF EKSTRAK ETANOL UNROASTED  
COFFE BEANS ( *Coffea canephora*) PADA TIKUS PUTIH  
MODEL GASTROENTERITIS INDUKSI  
ENTEROPATHOGENIC *Escherichia coli*

PENELITI : MOHAMAD KHAIRUL WAHID

UNIT/LEMBAGA/TEMPAT : UNIVERSITAS BRAWIJAYA

DINYATAKAN : LAIK ETIK

Malang, 20 Februari 2018  
Ketua Komisi Etik Penelitian  
Universitas Brawijaya



Prof. Dr. Erh. Aulanni'am, DES.  
NIP. 19600903 198802 2 001

**NB** : nama yang terlampir pada sertifikat etik hewan coba ini merupakan satu payung penelitian

No.	Nama
1	Anganti Sotyo Ayu Harindri
2	Beny Setiawan
3	Julian Mantara
4	Feby Rachma Satya Saraswati



## Lampiran 2. Determinasi Kopi Robusta



**PEMERINTAH PROVINSI JAWA TIMUR  
DINAS KESEHATAN  
UPT MATERIA MEDICA BATU**

Jalan Lahor No.87 Telp. (0341) 593396

**KOTA BATU 65313**

Nomor : 074/ 192b/ 102.7/ 2017  
Sifat : Biasa  
Perihal : Determinasi Tanaman Kopi Robusta

Memenuhi permohonan saudara :

Nama : Prof. Dr. Ir. DJALAL ROSYIDI, MP  
NIP : 19590927 198601 1 002  
Fakultas : FAKULTAS PETERNAKAN  
UNIVERSITAS BRAWIJAYA MALANG

1. Perihal determinasi tanaman kopi robusta
  - Kingdom : Plantae (Tumbuhan)
  - Subkingdom : Tracheobionta (Tumbuhan berpembuluh)
  - Super Divisi : Spermatophyta (Menghasilkan biji)
  - Divisi : Magnoliophyta (Tumbuhan berbunga)
  - Kelas : Dicotyledonae
  - Bangsa : Rubiales
  - Suku : Rubiaceae
  - Marga : Coffea
  - Jenis : *Coffea robusta* Link. ex De Willd.
  - Sinonim : *Coffea canephora* var *robusta*
  - Kunci Determinasi : 1b-2b-3b-4b-6b-7b-9b-10b-11b-12b-13b-14b-16a-239b-243b-244b-248b-249b-250a-251a-252b-1b-3b-4b-5b-6b-7a-1a.
2. Morfologi : Habitus: Perdu, tahunan, tinggi  $\pm$  5 m. Batang: Berkayu, keras, tegak, putih keabu-abuan. Daun: Tunggal, bulat telur, mengkilat, ujung runcing, tepi rata, pangkal tumpul, panjang 5-15 cm, lebar 4-6.5 cm, pertulangan menyirip, tangkai panjang 0.5-1 cm, hijau, pangkal daun membulat. Bunga: Majemuk, bentuk payung, di ketiak daun, kelopak berbagi lima, hijau, mahkota bentuk bintang, putih, benang sari lima, tangkai sari putih, kepala sari hitam, panjang putik  $\pm$  3 cm, kepala putik coklat, putih. Buah: Bulat telur, diameter  $\pm$  5 mm, masih muda hijau setelah tua merah. Biji: Bulat telur, berbelah dua, keras, putih kotor. Akar: Tunggang, kuning muda.
3. Nama Simplisia : Coffeae Semen / Biji Kopi.
4. Kandungan : Biji kopi robusta mengandung kafein dalam jumlah yang tinggi dibanding kopi arabica, juga mengandung trigonelline, senyawa polifenol, cafeic acid dan chlorogenic acid, diterpene ester, coffee oil, quinic acid, ethyphenol, dicaffeoylquinic acid, dimethyl disulfide, putrescine, trigoneline, dan asam amino.
5. Penggunaan : Penelitian.
6. Daftar Pustaka
  - Anonim. <http://www.plantamor.com/kopi>, diakses tanggal 17 Desember 2010.
  - Anonim. <http://www.warintek.ristek.go.id/Kopi>, diakses tanggal 21 Oktober 2010.
  - Syamsuhidayat, Sri Sugati dan Hutapea, Johny Ria. 1991. *Inventaris Tanaman Obat Indonesia 1*. Departemen Kesehatan Republik Indonesia: Badan Penelitian Dan Pengembangan Kesehatan.
  - Van Steenis, CGGJ. 2008. *FLORA untuk Sekolah di Indonesia*. Pradnya Paramita, Jakarta.

Demikian surat keterangan determinasi ini kami buat untuk dipergunakan sebagaimana mestinya.

Batu, 10 Mei 2017


Kepala UPT Materia Medica Batu

Dr. Husin R.M., Drs., Apt., M.Kes.  
NIP. 19611102 199103 1 003





### Lampiran 3. Surat Keterangan Ekstrak Tumbuhan Kopi



**PEMERINTAH PROVINSI JAWA TIMUR**  
**DINAS KESEHATAN**  
**UPT MATERIA MEDICA BATU**  
 Jalan Lahor No.87 Telp. (0341) 593396  
**KOTA BATU 65313**

---

Nomor : 074 / 192c / 102.7 / 2017  
 Sifat : Biasa  
 Perihal : Surat Keterangan Ekstrak Tanaman Kopi

Memenuhi permohonan saudara :

Nama : Prof. Dr. Ir. DJALAL ROSYIDI, MP  
 NIP : 19590927 198601 1 002  
 Fakultas : FAKULTAS PETERNAKAN  
 UNIVERSITAS BRAWIJAYA MALANG

Kami menerangkan bahwa yang bersangkutan telah melakukan ekstraksi untuk bahan penelitian dari tanaman Kopi Arabica (*Coffea arabica* L.) dan Kopi Robusta (*Coffea robusta* Link. ex De Wild.). Adapun proses pembuatan dilakukan di Laboratorium Fitokimia UPT Materia Medica Batu dengan perincian sebagai berikut:

**BAHAN** : - Serbuk biji kopi: a) Kopi Robusta Dampit; b) Kopi Robusta Lampung; c) Kopi Arabica Aceh; dan d) Kopi Arabica Bali  
 - Etanol 90%  
 - Penyaring kain

**ALAT** : - Toples tertutup - Erlenmeyer  
 - Corong gelas - Rotary evaporator  
 - Timbangan analitik - Beaker glass  
 - Gelas ukur - Alkoholmeter  
 - Botol - Shaker digital  
 - Waterbath


**Cara Kerja :**

1. Serbuk biji kopi: a) Robusta Dampit; b) Robusta Lampung; c) Arabica Aceh; dan d) Arabica Bali ditimbang sebanyak: a) 428 gr; b) 414 gr; c) 646 gr; dan d) 516 gr.
2. Serbuk yang telah ditimbang dibasahi dengan pelarut etanol 90% masing-masing sebanyak 500 ml.
3. Serbuk yang telah dibasahi dengan pelarut dipindahkan ke dalam toples, diratakan dan ditambahkan pelarut etanol 90% sampai terendam (pelarut yang digunakan minimal 2 kali berat atau lebih). Pelarut yang ditambahkan sebanyak 1,5 L. Kemudian toples ditutup dengan rapat selama 24 jam. Dan dishaker di atas shaker digital dengan kecepatan 50 rpm.
4. Ekstrak cair disaring dengan penyaring kain dan hasilnya ditampung dalam Erlenmeyer.
5. Ampas kemudian dimasukkan lagi dalam toples dan ditambahkan pelarut sampai terendam (minimal pelarut 5 cm di atas permukaan), dalam hal ini digunakan 1,5 L pelarut.
6. Biarkan semalam atau 24 jam di atas shaker kecepatan 50 rpm.
7. Hasil ekstrak cair pertama dan kedua dijadikan satu dan diuapkan dengan menggunakan rotary evaporator. Diperlukan waktu 4 jam untuk evaporasi masing-masing bahan.
8. Ekstrak yang dihasilkan dievaporasi / diuapkan di atas water bath selama 2 jam.

**Hasil :**

1. Dari serbuk biji kopi: a) Robusta Dampit 428 gram; b) Robusta Lampung 414 gram; c) Arabica Aceh 646 gram; dan d) Arabica Bali 516 gram, yang diekstraksi dengan menggunakan pelarut etanol 90% masing-masing sebanyak 3 L dihasilkan ekstrak cair sebanyak: a) 60 ml; b) 50 ml; c) 85 ml; dan d) 40 ml.

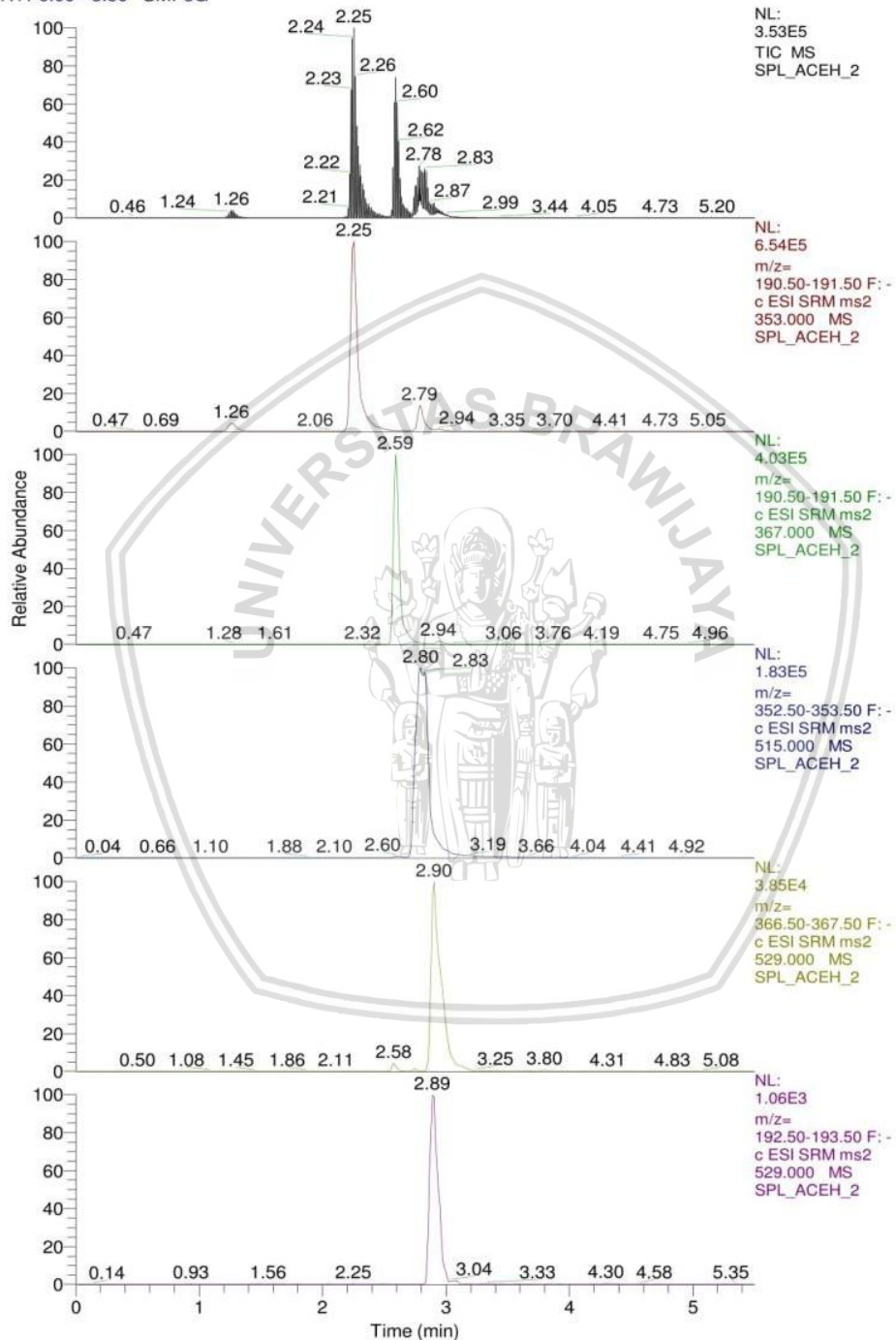
Demikian keterangan ini kami buat untuk dipergunakan sebagaimana mestinya.

Batu, 10 Mei 2017  
 Kepala UPT Materia Medica Batu  
  
 Drs. Husin R.M., Drs., Apt., M.Kes.

## Lampiran 4. Hasil Uji LC-MS

E:\DATA RAW\2017\sim\SPL\_ACEH\_2

RT: 0.00 - 5.50 SM: 5G



### Identifikasi Hasil Uji LC-MS

Peak	MS	m/z	Kandungan
1	353	190.50-191.50	3-O-caffeoylquinic acid
2	367	190.50-191.50	5-O-feruloylquinic acid
3	515	352.50-353.50	dicafeoylquinic acid
4	529	366.50-367.50	4-O-caffeoyl-5-O-feruloylquinic acid
5	529	192.50-193.50	3-O-feruloyl-4-O-caffeoylquinic acid

Identifikasi bahan aktif kopi hijau dengan metode LC-MS mendapatkan 5 peaks yaitu peak 1 dengan molar mass 353 teridentifikasi sebagai 3-O-caffeoylquinic acid atau lebih dikenal dengan asam klorogenat. Peak 2 dengan molar mass 367 teridentifikasi sebagai 5-O-feruloylquinic acid, peak 3 dengan molar mass teridentifikasi sebagai dicafeoylquinic acid, peak 4 dengan molar mass 529 teridentifikasi sebagai 4-O-caffeoyl-5-O-feruloylquinic acid dan peak 5 dengan molar mass 529 dan m/z 192,50 teridentifikasi sebagai 3-O-feruloyl-4-O-caffeoylquinic acid (Mullen *et al*, 2011).

**Tabel 7.4.** Identifikasi Komponen Buah Kopi dengan Spektrum

$t_R$	$[M - H]^- (m/z)$	$MS^2 (m/z)$	compd
8.5	353	191, 179	3-O-caffeoylquinic acid
15.0	353	173, 179	4-O-caffeoylquinic acid
15.8	353	191	5-O-caffeoylquinic acid
17.5	367	193 (191 trace)	3-O-feruloylquinic acid
24.6	337	173, 193	5-O-p-coumaroylquinic acid
27.9	367	191, 173	4-O-feruloylquinic acid
28.4	335	161, 135, 179	putative 3-O-caffeoylquinic lactone
29.7	335	161, 135, 179	putative 4-O-caffeoylquinic lactone
30.6	367	191	5-O-feruloylquinic acid
32.9	367	179	unknown: putative methyl-5- caffeoylquinic acid
42.1	515	353	3,4-O-dicafeoylquinic acid
43.7	515	353	3,5-O-dicafeoylquinic acid
45.9	515	353	4,5-O-dicafeoylquinic acid
48.5	529	367, 335, 193, 179	3-O-feruloyl-4-O-caffeoylquinic acid
52.2	529	353, 367, 335, 173	4-O-caffeoyl-5-O-feruloylquinic acid
54.4	497	335, 161	putative dicafeoylquinic lactone

Sumber: (Mullen *et al*, 2011).

## Lampiran 5. Perhitungan Konversi Dosis dari Mencit ke Tikus

### A. Perhitungan dosis ekstrak

Rentang dosis ekstrak *green coffee* robusta pada mencit yaitu 50-250 mg/KgBB PO sebelum makan (Haque *et al.*, 2013). Maka rentang dosis ekstrak *green coffee* robusta untuk tikus dengan BB 200 mg yaitu:

- a. Batas bawah (50 mg/kgBB pada mencit BB 20 gr)

= dosis x faktor konversi mencit ke tikus

= 50 mg/kgBB x 7

= 350 mg/kgBB

- b. Batas atas (250 mg/kg BB pada mencit BB 20 gr)

= dosis x faktor konversi mencit ke tikus

= 250 mg/kgBB x 7

= 1750 mg/kgBB

Jadi rentang dosis ekstrak *green coffee* robusta pada tikus dengan BB 200 gr berkisar 350 – 1750 mg/kgBB PO.

Sehingga ditetapkan dosis untuk tikus yaitu 500, 1000, dan 1500 mg/kgBB.

### B. Perhitungan dosis dexamethasone

Dosis dexamethasone yaitu 5 mg/kgBB b.i.d IP sebelum makan pada tikus induksi imunsupresan (Sulaiman *et al.*, 2010). Konsentrasi dari Dexamethasone adalah 10 mg/5 ml, sehingga volume obat yang diberikan yaitu :

= Dosis x Berat badan

Konsentrasi

= 5 mg/kgBB x 0,2kg

0,5

= 0,5 ml/ ekor

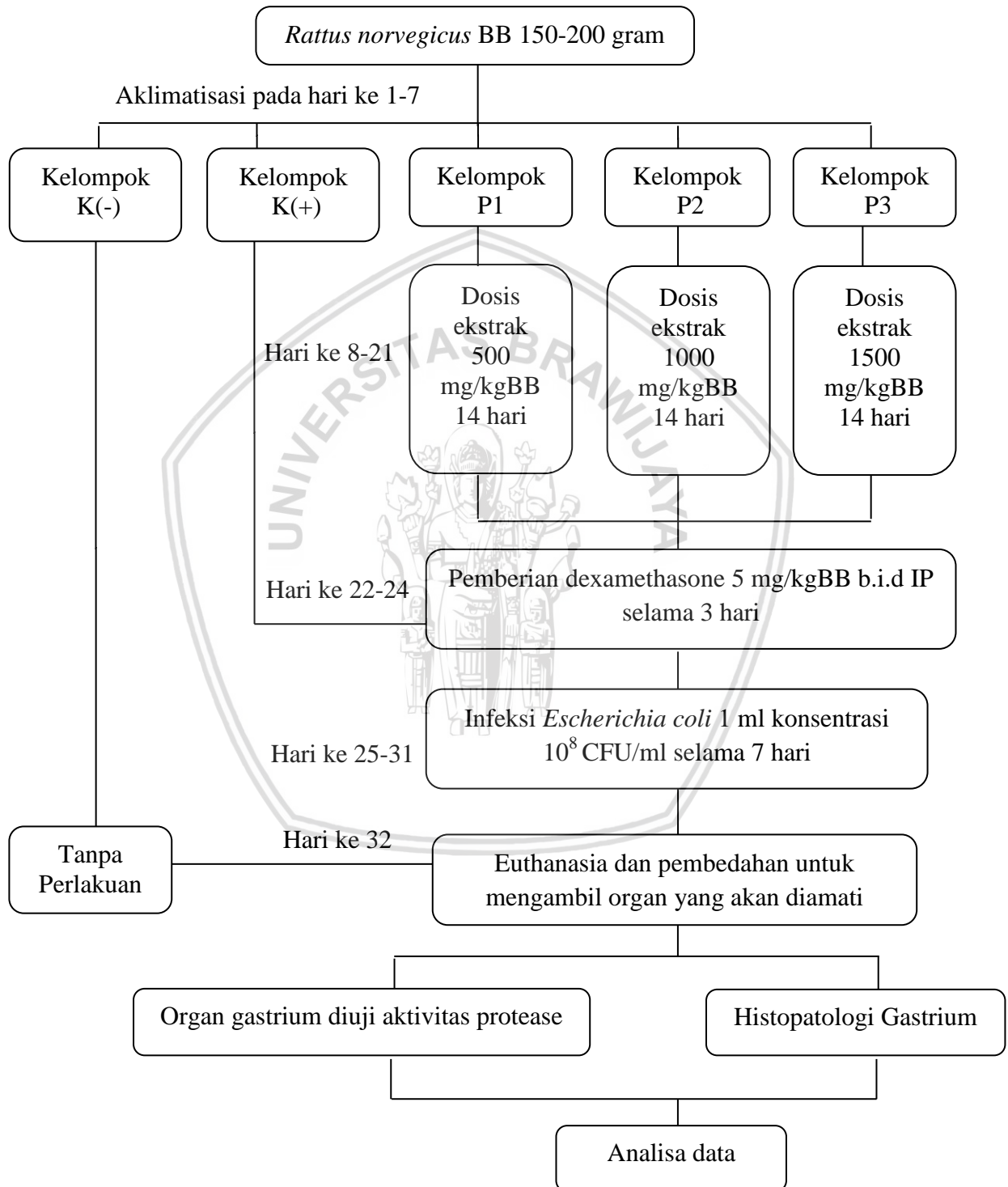


**Lampiran 6.** Tabel Konversi Dosis (Laurence *and* Bacharach, 1964).

Dicari Diketa Hui	Men cit 20 g	Tikus 200 g	Marmut 400 g	Kelin ci 1,5 kg	Kucing 1,5 kg	Kera 4 kg	Anjing 12 kg	Manu sia 70 kg
Mencit 20 g	1,0	7,0	12,23	27,80	29,7	64,10	124,20	387,9
Tikus 200 g	0,14	1,0	1,74	3,9	4,20	9,20	17,80	56,0
Marmu 400 g	0,08	0,57	1,0	2,25	2,40	5,20	10,20	31,50
Kelinci 1,5 kg	0,04	0,25	0,44	1,0	1,08	2,40	4,50	14,20
Kucing 1,5 kg	0,03	0,23	0,41	0,92	1,0	2,20	4,10	13,0
Kera 4 kg	0,01 6	0,11	0,19	0,42	0,43	0,1	1,9	6,1
Anjing 12 kg	0,00 8	0,06	0,10	0,22	1,24	0,52	1,0	3,10
Manusia 70 kg	0,00 26	0,018	0,031	0,07	0,076	0,16	0,32	1,0




Lampiran 7. Skema Penelitian



## Lampiran 8 Hasil Pengukuran Aktivitas Protease

91



KEMENTERIAN RISET, TEKNOLOGI DAN PENDIDIKAN TINGGI  
UNIVERSITAS BRAWIJAYA FAKULTAS MIPA  
JURUSAN KIMIA

Jl. Veteran, Malang 65145, Jawa Timur, Indonesia Telp : +62-341-575838, fax : +62-341-554403  
<http://kimia.ub.ac.id> email : [kimia@ub.ac.id](mailto:kimia@ub.ac.id)

---

### LAPORAN HASIL ANALISA

NO : H.30 / RT.5 / T.1 / R.0 / TT. 150803 / 2017

- Data Konsumen
  - Nama : Anganti Sotyo Ayu Harindri
  - Instansi : Fakultas Kedokteran Hewan Universitas Brawijaya
  - Alamat : Jl. MT Haryono Malang
  - Telepon : 081805132268
  - Status : Mahasiswa-S1
  - Keperluan Analisis : Uji Kualitas
- Sampling Dilakukan Oleh : Konsumen
- Identifikasi Sampel
  - Nama Sampel : *Lambung Tikus*
  - Wujud : Padat
  - Warna : Merah
  - Bau : Berbau
- Prosedur Analisis : Dilakukan oleh UPT Layanan Analisa dan Pengukuran Jurusan Kimia FMIPA Universitas Brawijaya Malang
- Penyampaian Laporan Hasil Analisis : Diambil Langsung
- Tanggal Terima Sampel : 02 Oktober 2017
- Data Hasil Analisis :

No	Kode	Parameter	Hasil Analisis		Metode Analisis	
			Kadar	Satuan	Pereaksi	Metode
1	L1P1	Protease	3,29 ± 0,01	μmol tirosin/g enzim menit	TCA	Spektrofotometri
2	L1P2	Protease	4,40 ± 0,02	μmol tirosin/g enzim menit	TCA	Spektrofotometri
3	L1P3	Protease	4,86 ± 0,00	μmol tirosin/g enzim menit	TCA	Spektrofotometri
4	L1P4	Protease	3,80 ± 0,01	μmol tirosin/g enzim menit	TCA	Spektrofotometri
5	L2P1	Protease	1,86 ± 0,01	μmol tirosin/g enzim menit	TCA	Spektrofotometri
6	L2P2	Protease	5,26 ± 0,02	μmol tirosin/g enzim menit	TCA	Spektrofotometri
7	L2P3	Protease	4,66 ± 0,01	μmol tirosin/g enzim menit	TCA	Spektrofotometri
8	L2P4	Protease	3,82 ± 0,01	μmol tirosin/g enzim menit	TCA	Spektrofotometri
9	L3P1	Protease	1,36 ± 0,25	μmol tirosin/g enzim menit	TCA	Spektrofotometri
10	L3P2	Protease	3,18 ± 0,00	μmol tirosin/g enzim menit	TCA	Spektrofotometri
11	L3P3	Protease	3,37 ± 0,00	μmol tirosin/g enzim menit	TCA	Spektrofotometri
12	L3P4	Protease	4,24 ± 0,00	μmol tirosin/g enzim menit	TCA	Spektrofotometri
13	L(+ )P1	Protease	4,58 ± 0,01	μmol tirosin/g enzim menit	TCA	Spektrofotometri
14	L(+ )P2	Protease	3,46 ± 0,01	μmol tirosin/g enzim menit	TCA	Spektrofotometri
15	L(+ )P3	Protease	3,42 ± 0,00	μmol tirosin/g enzim menit	TCA	Spektrofotometri



16	<b>L(+)P4</b>	Protease	3,44 ± 0,00	μmol tirosin/g enzim menit	TCA	Spektrofotometri
17	<b>L(-)P1</b>	Protease	4,45 ± 0,01	μmol tirosin/g enzim menit	TCA	Spektrofotometri
18	<b>L(-)P2</b>	Protease	5,69 ± 0,01	μmol tirosin/g enzim menit	TCA	Spektrofotometri
19	<b>L(-)P3</b>	Protease	3,54 ± 0,01	μmol tirosin/g enzim menit	TCA	Spektrofotometri
20	<b>L(-)P4</b>	Protease	3,22 ± 0,00	μmol tirosin/g enzim menit	TCA	Spektrofotometri

Catatan:

1. Hasil analisis ini adalah nilai rata-rata pengerjaan analisis secara duplo,
2. Hasil analisis ini hanya berlaku untuk sampel yang kami terima dengan kondisi sampel saat itu.

Malang, 08 November 2017



Mengetahui:  
Ketua Jurusan Kimia,

Masruri, S.Si., M.Si., Ph.D  
NIP. 19731020 200212 1 001

Ketua UPT Layanan Analisa dan  
Pengukuran,

Moh. Farid Rahman, S.Si., M.Si  
NIP. 19700720 199702 1 001

## Lampiran 9. Data Statistik Aktivitas Protease

### Uji Normalitas

Tests of Normality							
	Kelompok_Perlakuan	Kolmogorov-Smirnov <sup>a</sup>			Shapiro-Wilk		
		Statistic	df	Sig.	Statistic	df	Sig.
Kadar_Aktivitas_Protease	K(-)	,232	4	.	,930	4	,594
	K(+)	,429	4	.	,657	4	,003
	P1	,176	4	.	,983	4	,922
	P2	,228	4	.	,930	4	,594
	P3	,297	4	.	,921	4	,542
a. Lilliefors Significance Correction							

### Uji Homogenitas

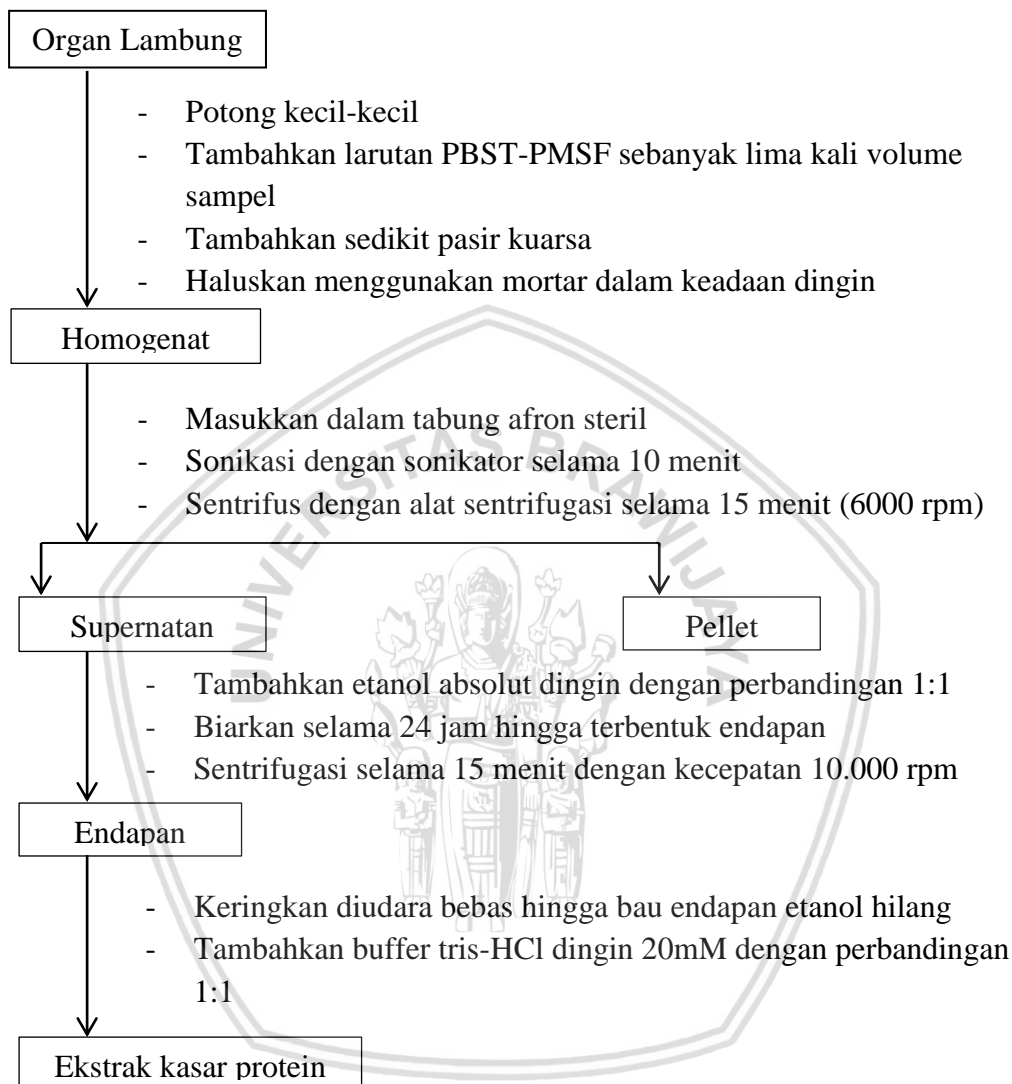
Test of Homogeneity of Variances					
		Levene Statistic	df1	df2	Sig.
Kadar_Aktivitas_Protease	Based on Mean	,783	4	15	,554
	Based on Median	,735	4	15	,582
	Based on Median and with adjusted df	,735	4	10,824	,587
	Based on trimmed mean	,781	4	15	,555

### Uji One Way ANOVA (Analysis of Variance)

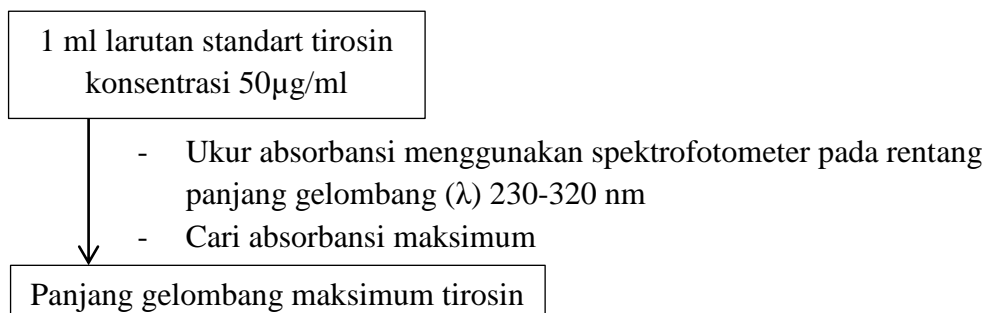
ANOVA					
Kadar_Aktivitas_Protease					
	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	3,441	4	,860	,757	,569
Within Groups	17,051	15	1,137		
Total	20,492	19			

## Lampiran 10. Diagram Kerja Pengukuran Aktivitas Protease

### 4.1 Isolasi Protein

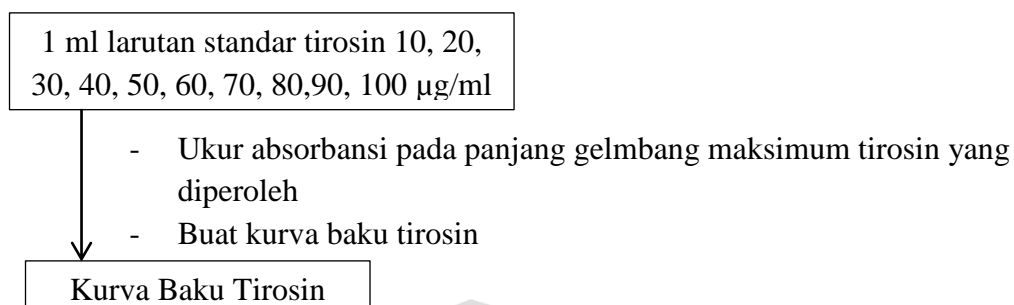


### 4.2 Penentuan Panjang Gelombang Maksimum Tirosin

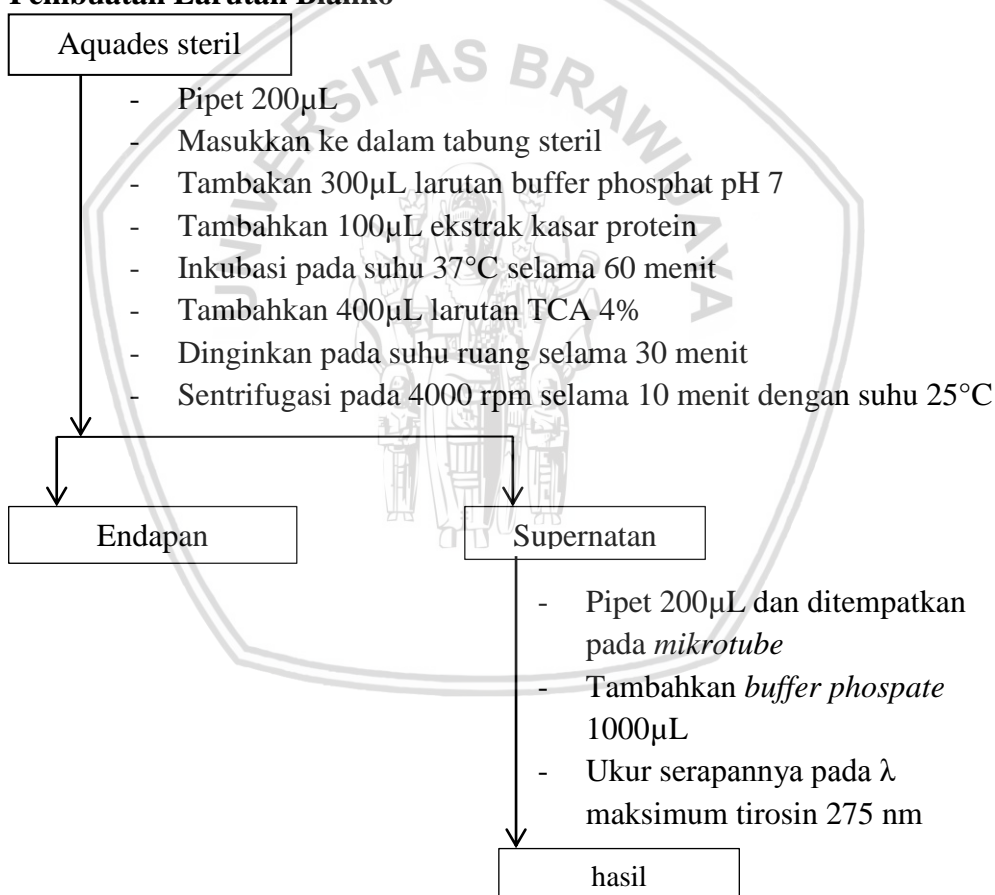




#### 4.3 Pembuatan Kurva Baku Standar Tirosin



#### 4.4 Pembuatan Larutan Blanko



#### 4.5 Perhitungan Aktivitas Protease

Larutan Kasein 500 ppm

- Pipet sebanyak 200  $\mu\text{L}$
- Masukkan ke dalam *mikrotube*
- Tambahkan 300  $\mu\text{L}$  larutan *buffer phosphat* pH 7
- Tambahkan 100  $\mu\text{L}$  larutan ekstrak kasar protein
- Inkubasi pada suhu 37°C selama 60 menit
- Tambahkan 400  $\mu\text{L}$  larutan TCA 4%
- Dinginkan pada suhu ruang selama 30 menit
- Sentrifugasi pada 4000 rpm selama 10 menit dengan suhu 25°C

Endapan

Supernatan

- Pipet 200  $\mu\text{L}$  dan ditempatkan pada *mikrotube*
- Tambahkan *buffer phosphat* 1000  $\mu\text{L}$
- Ukur nilai absorbansi dengan spektrofotometer dengan panjang gelombang maksimum tirosin yang diperoleh

Hasil

**Lampiran 11.** Komposisi larutan dalam Uji Aktivitas Protease

No.	Larutan	Komposisi
1.	Larutan Stok Tirosin	0,025 gram tirosin dan 25 mL akuades
2.	Larutan Kasein	0,025 gr kasein dan 25 mL akuades
3.	Larutan TCA 4%	4 gr TCA, 100 mL <i>buffer phosphate</i> pH 7
4.	Larutan Blanko	200 $\mu$ L akuades steril, 300 $\mu$ L <i>buffer phosphate</i> pH 7, 100 $\mu$ L ekstrak kasar protease, larutan 400 $\mu$ L TCA 4%
5.	Larutan Sampel	Larutan kasein 200 $\mu$ L, 300 mL <i>buffer phosphate</i> pH 7, 100 $\mu$ L ekstrak kasar protease, larutan 400 $\mu$ L TCA 4%

## Lampiran 12. Tahapan Perhitungan Aktivitas Protease

### 7.1 Penentuan Panjang Gelombang ( $\lambda$ ) Maksimum

**Tabel 7.1** Absorbansi dari Larutan Standar Tirosin pada Panjang Gelombang ( $\lambda$ )

Panjang gelombang (nm)	Absorbansi
240	0,027
250	0,028
260	0,042
270	0,072
275	<b>0,084</b>
280	0,074
290	0,04
300	0,022
310	0,012
320	0,002

Keterangan: pada panjang gelombang 275 nm di dapatkan nilai absorbansi tertinggi yaitu 0,084

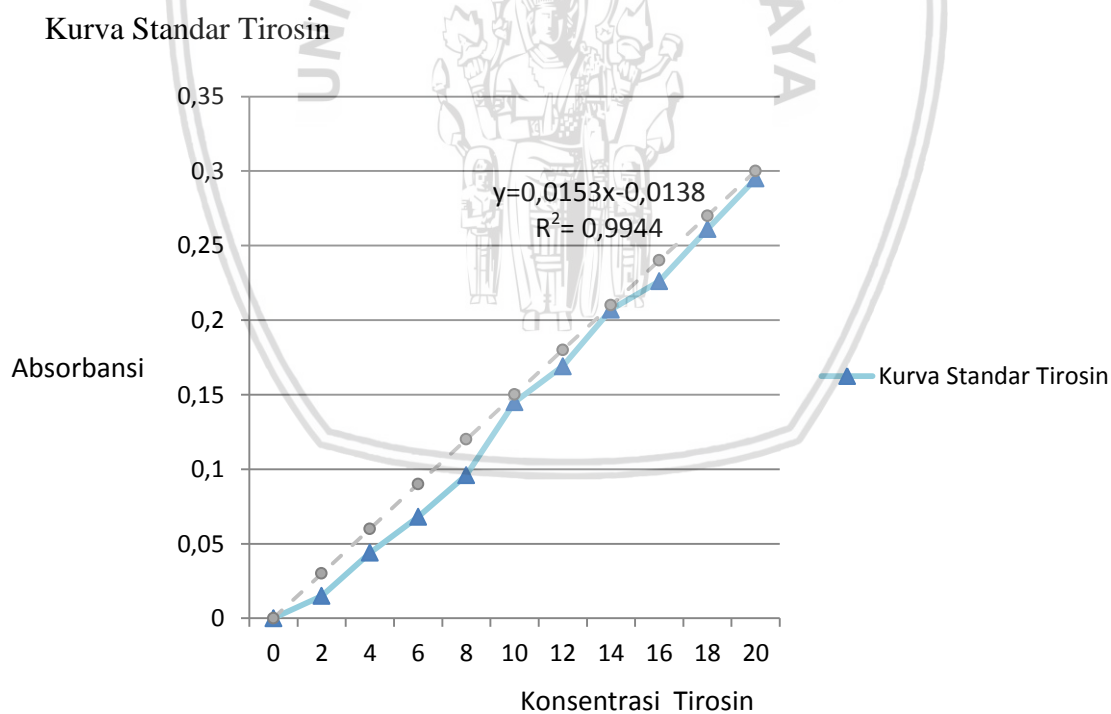


Gambar 7.1 Kurva Penentuan Panjang Maksimum Tirosin

## 7.2 Pembuatan Kurva Baku Tirosin

**Tabel 7.1** Absorbansi dari Kurva Baku Tirosin

Tirosin [ppm]	Absorbansi
0	0
2	0,015
4	0,044
6	0,068
8	0,096
10	0,145
12	0,169
14	0,207
16	0,226
18	0,261
20	0,295



**Gambar 7.2** Kurva Standar Tirosin



### 7.3 Penghitungan Aktivitas Protease

Aktivitas Protease dihitung dari pembentukan produk tirosin. Absorbansi sampel yang didapatkan dapat dihitung produk tirosinya dengan menggunakan persamaan regresi linear kurva standar tirosin, kemudian dari hasil konsentrasi tirosin dihitung aktivitas proteasanya. Pengukuran aktivitas enzim protease dilakukan berdasarkan metode Walter (1984) menggunakan rumus:

$$\text{Aktivitas enzim} = \frac{[\text{Tirosin}]}{Mr \text{ Tirosin}} \times \frac{v}{pxq} \times fp$$

Keterangan :

Mr = Massa relatif tirosin (181 μg/μmol)

V = volume total (mL)

q = waktu inkubasi (menit)

fp = faktor pengenceran

p = jumlah enzim (mL)

Konsentrasi tirosin didapat dengan menghitung menggunakan regresi linear sebagai berikut :

$$y = 0,015x - 0,013$$

Keterangan :





y = nilai absorbansi





x = konsentrasi tiroso (ppm)

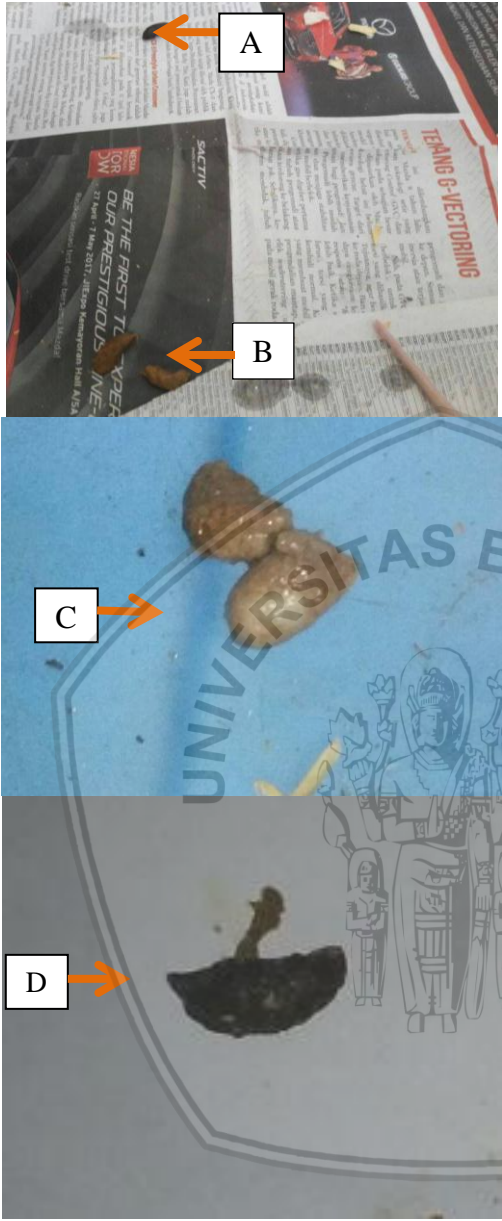
Konsentrasi yang didapat, dimasukkan dalam rumus agar didapat Aktivitas protease sebagai berikut:

$$\text{Aktivitas enzim} = \frac{[\text{Tirosin}]}{Mr \text{ Tirosin}} \times \frac{v}{pxq} \times fp$$

**Lampiran 13. Dokumentasi**

GAMBAR	KETERANGAN
	Kondisi kandang saat pemeliharaan
	Sterilisasi alat
	Pengenceran ekstrak
	Ekstrak yang telah diencerkan sesuai dosis yang dibutuhkan

	<p>Sonde ekstrak <i>green coffee</i> Robusta pada tikus selama 14 hari</p>
	<p>Injeksi IP dexamethasone dosis 5mg/kgBB sebanyak 0,5 ml selama 3 hari <i>b.i.d</i></p>
	<p>Biakan <i>Escherichia coli</i> pada media EMB (<i>Eosin Methylene Blue</i>)</p>
	<p>Pembuatan larutan <i>Escherichia coli</i> <math>3 \times 10^8</math> CFU</p>

 <p>The image contains three photographs of rat feces, each labeled with a letter in a white box with an orange arrow pointing to it.   - Photo A: A small, dark, cylindrical pellet on a newspaper.   - Photo B: A larger, light brown, irregular mass on a newspaper.   - Photo C: A large, light brown, irregular mass on a blue surface.   - Photo D: A dark, irregular mass on a grey surface.</p>	<p>A. Feses kontrol negatif : warna coklat kehitaman, konsistensi padat (Skor:3)</p> <p>B. Feses pada hewan P (perlakuan) : warna coklat terang, konsistensi seperti pasta ( Skor: 4)</p> <p>C. Feses kontrol positif : warna coklat muda, konsistensi lunak, terlihat berair ( Skor: 5)</p> <p>D. Feses tikus pra- penelitian: warna coklat kehitaman, konsistensi padat ( Skor: 3)</p>
---	--

**Lampiran 14.** Tabel Berat Badan Tikus

Kelompok	Sebelum Pemberian Dexamethasone	H+7 pemberian larutan <i>Escherichia coli</i>
<b>KN 1</b>	240	262
<b>KN 2</b>	248	269
<b>KN 3</b>	248	258
<b>KN 4</b>	247	261
<b>KP 1</b>	232	197
<b>KP 2</b>	238	203
<b>KP 3</b>	236	207
<b>KP 4</b>	234	199
<b>P1.1</b>	207	201
<b>P1.2</b>	212	209
<b>P1.3</b>	213	201
<b>P1.4</b>	205	196
<b>P2.1</b>	198	187
<b>P2.1</b>	220	209
<b>P2.1</b>	214	201
<b>P2.1</b>	225	210
<b>P3.1</b>	227	201
<b>P3.1</b>	210	191
<b>P3.1</b>	232	204
<b>P3.1</b>	219	197